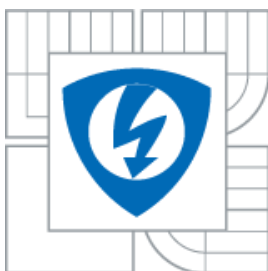




VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



**FAKULTA ELEKTROTECHNIKY A KOMUNIKAČNÍCH
TECHNOLOGIÍ**
ÚSTAV BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ

**FACULTY OF ELECTRICAL ENGINEERING AND COMMUNICATION
DEPARTMENT OF BIOMEDICAL ENGINEERING**

SIMULACE ELEKTROFYZIOLOGICKÝCH EXPERIMENTŮ

SIMULATION OF ELECTROPHYSIOLOGICAL EXPERIMENTS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE
BACHELOR'S THESIS

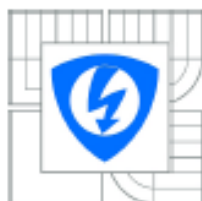
AUTOR PRÁCE
AUTHOR

SVATOPLUK KUBÁČEK

VEDOUCÍ PRÁCE
SUPERVISOR

ING. MILAN RYCHTÁŘIK

BRNO 2011



VYSOKÉ UČENÍ
TECHNICKÉ V BRNĚ

Fakulta elektrotechniky
a komunikačních technologií

Ústav biomedicínského inženýrství

Bakalářská práce

bakalářský studijní obor
Biomedicínská technika a bioinformatika

Student: Svatopluk Kubáček
Ročník: 3

ID: 70076
Akademický rok: 2010/2011

NÁZEV TÉMATU:

Simulace elektrofyzilogických experimentů

POKYNY PRO VYPRACOVÁNÍ:

Seznamte se s principy měření elektrofyzilogických dějů na izolovaných buňkách a vypracujte rešerši zabývající se danou problematikou. Podle uvedené literatury realizujte v prostředí MATLAB model, který bude demonstrovat techniky měření metodou voltage clamp, patch clamp a current clamp včetně změny extracelulární a intracelulárního prostředí a mechanismu účinku vybraných blokátorů. Výstupy z modelu porovnejte s naměřenými daty a dostupnou literaturou.

Práce musí obsahovat teoretický rozbor problematiky, popis postupu a použitých metod pro modelování, dále musí obsahovat funkční vybrané modely realizované v prostředí MATLAB včetně přehledného GUI a srovnání výsledků s dostupnou literaturou.

DOPORUČENÁ LITERATURA:

- [1] HAMMIL, OP., MARTY, A., NEHER, E., SAKMANN, B.: Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 1981, vol. 391, s. 85-100
- [2] PANDIT, S., V., et. al. A Mathematical Model of Action Potential Heterogeneity In Adult Rat Left Ventricular Myocytes, *Biophysical J.*, 2001, vol. 81, s.3029-3051

Termín zadání: 7.2.2011

Termín odevzdání: 27.5.2011

Vedoucí práce: Ing. Milan Rychtářík

prof. Ing. Ivo Provazník, Ph.D.

Předseda oborové rady

UPOZORNĚNÍ:

Autor bakalářské práce nesmí při vytváření bakalářské práce porušit autorské práva třetích osob, zejména nesmí zasahovat nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a musí si být plně vědom následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku č.40/2009 Sb.

Abstrakt

Simulace elektrofyzilogických experimentů umožňuje získávání cenných informací o bioelektrických dějích probíhajících na izolovaných buňkách. Tato práce se zabývá základními principy, které umožňují vznik bioelektrických jevů, a technikami měření potřebné k získání informací o těchto jevech. Výsledkem této práce je vytvořený program umožňující simulovat měřicí techniky aplikované na model Luo a Rudy. Program obsahuje základní měřicí metody current clamp a voltage clamp s možností měnit základní parametry modelu. Výsledky této práce jsou poté srovnány s dostupnou literaturou.

Abstract

Simulation of electrophysiological experiments enables to gain valuable data about bioelectrical processes occurring on isolated cells. This thesis deals with basic principals allowing the creation of bioelectrical phenomenons and measuring techniques that need to be used in order to collect information about these phenomenons. The outcome of the thesis is a programme that serves as an instrument for simulation of measuring techniques applied on Luo-Rudy model. The programme contains basic measuring techniques – current clamp and voltage clamp – providing the possibility to change basic parameters of the model. The results of this work are later compared with the accessible literature.

Klíčová slova

Akční potenciál; iontové kanály; patch clamp; Luo-Rudy model; buněčná membrána; membránové proudy; skleněná mikroelektroda; diferenciální rovnice; Matlab; current clamp; voltage clamp

Keywords

Action potential, ionic channels; patch clamp; Luo-Rudy model; cell membrane; membrane currents; glass microelectrode; differential equations; Matlab; current clamp; voltage clamp

Bibliografická citace

KUBÁČEK, S. *Simulace elektrofyziologických experimentů*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, 2011. 61 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Milan Rychtárik.

Prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci na téma Simulace elektrofyzilogických experimentů jsem vypracoval samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou všechny citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce.

Jako autor uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že v souvislosti s vytvořením této práce jsem neporušil autorská práva třetích osob, zejména jsem nezasáhl nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a jsem si plně vědom následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení § 152 trestního zákona č. 140/1961 Sb.

V Brně dne 27. května 2011

.....
podpis autora

Poděkování

Děkuji vedoucímu bakalářské práce Ing. Milanu Rychtárikovi za účinnou metodickou, pedagogickou a odbornou pomoc a další cenné rady při zpracování mé bakalářské práce.

V Brně dne 27. května 2011

.....
podpis autora

Obsah

Seznam obrázků	3
Seznam tabulek.....	5
Úvod.....	6
1. Základy elektrofyziologie a bioelektrických jevů.....	7
1.1 Rozbor vnějšího a vnitřního prostředí buňky	7
1.2 Rozbor buněčné membrány	8
1.3 Struktura a funkce kanálů.....	8
1.4 Struktura a funkce přenašečových systémů.....	10
1.5 Klidové membránové napětí	11
1.6 Akční napětí.....	13
2. Modelování bioelektrických jevů	14
2.1 Modelování buněčné membrány	14
2.2 Vývoj modelování elektrické aktivity buněk.....	17
2.3 Model Luo Rudy.....	18
3. Metody měření signálů na buňce	22
3.1 Current clamp.....	22
3.2 Voltage clamp.....	23
3.3 Patch clamp technika	25
3.4 Varianty techniky patch clamp	28
4 Realizace modelu Luo a Rudy v prostředí Matlab.....	32
4.2 Řešení modelu Luo a Rudy v programu MATLAB	32
4.2 Realizace metody vnuceného proudu na model Luo a Rudy	35
4.3 Realizace metody vnuceného napětí na model Luo a Rudy.....	36
5 Luo-Rudy program	37
5.1 Nastavení základních parametrů modelu	37
5.2 Grafické výstupy	39
5.3 Zobrazení grafických výstupů	40
5.4 Výběr metody měření.....	41
6 Výsledky Luo_Rudy_program.....	46

6.1 Srovnání výsledků s dostupnou literaturou.....	46
6.2 Další výsledky	56
Závěr.....	59
Seznam literatury	60

Seznam obrázků

Obrázek 1: a) Chemické vrátkování, b) Napěťové vrátkování[1].....	9
Obrázek 2: Způsoby přenosu iontů[2].....	10
Obrázek 3: Schéma přenašečového systému[1]	11
Obrázek 4: Průběh akčního napětí[1]	13
Obrázek 5: Náhradní schéma reálné membrány[2]	14
Obrázek 6: Náhradní elektrické schéma membrány podle Hodgkina a Huxleyho[5].....	16
Obrázek 7: Metoda vnuceného proudu (current clamp)[2]	23
Obrázek 8: Metoda vnuceného napětí (voltage clamp)[2]	24
Obrázek 9: Schéma metody voltage clamp se dvěma elektrodami[12]	24
Obrázek 10: Výroba skleněných mikrokapilár[4]	27
Obrázek 11: Mikrokapilára nepokryta (horní) a pokryta látkou Sylgard (spodní)[4].....	27
Obrázek 12: Schéma různých variant patch clamp techniky[4]	29
Obrázek 13: Záznam jednokanálového proudu aktivovaný acetylcholinem[4]	30
Obrázek 14: Použití funkce ode15s pro metodu vnuceného proudu.....	36
Obrázek 15: Aplikace funkce ode15s pro metodu vnuceného napětí	36
Obrázek 16: Grafické rozhraní Luo_Rudy_program	37
Obrázek 17: Nastavení základních parametrů.....	38
Obrázek 18: Blokace membránových kanálů.....	39
Obrázek 19: Grafické výstupy.....	40
Obrázek 20: Zobrazení grafů.....	41
Obrázek 21: Výběr metody měření	41
Obrázek 22: Ukázka stimulačních impulsů metody vnuceného proudu	42
Obrázek 23: Metoda vnuceného napětí – obdélníkový impuls	43
Obrázek 24: Obdélníkové napěťové impulsy.....	43
Obrázek 25: Panel pro ramp impuls.....	43

Obrázek 26: Stoupající průběh ramp pulsu	44
Obrázek 27: Klesající průběh ramp pulsu	44
Obrázek 28: Panel sekvence napěťových impulsů	44
Obrázek 29: Sekvence napěťových impulsů	45
Obrázek 30: Akční potenciál[11]	46
Obrázek 31: Akční potenciál Luo_Rudy_program	47
Obrázek 32: a) Fast sodium current, b) Vrátkovací proměnné[11].....	48
Obrázek 33: Výstup Luo_Rudy_program - fast sodium current a jeho vrátkovací proměnné	49
Obrázek 34: a)Slow inward current, b) Vrátkovací proměnné[11].....	50
Obrázek 35: Slow inward current s vrátkovacími proměnnými a vápníkovou absorpcí vytvořený v Luo_rudy_program	51
Obrázek 36: Background current[11]	51
Obrázek 37: Background current vytvořený v Luo_Rudy_program	52
Obrázek 38: Akční potenciály a průběhy iontových proudů pro různé koncentrace iontů[6] .	53
Obrázek 39: Total time-dependent potassium current pro $K_o=7\text{mM}$ (modrá) a $K_o=3\text{mM}$ (zelená)	54
Obrázek 40: Stimulační proudový impuls a průběhy akčního potenciálu pro různé koncentrace draslíkových iontů	54
Obrázek 41: Time-dependent potassium current pro $K_o=7\text{mM}$ (modrá) a $K_o=3\text{mM}$ (zelená)	55
Obrázek 42: Slow inward current pro $K_o=7\text{mM}$ (modrá) a $K_o=3\text{mM}$ (zelená)	55
Obrázek 43: Obdélníkové napěťové impulsy a odezva celkového iontového proudu.....	56
Obrázek 44: Iontové membránové proudy jako odezva na obdélníkový napěťový impuls.....	56
Obrázek 45: Pilovitý napěťový ramp impuls a odezva celkového iontového proudu	57
Obrázek 46: Iontové membránové proudy jako odezva na pilovitý napěťový ramp impuls ...	57
Obrázek 47: Sekvence obdélníkových impulsů a odezva celkového iontového proudu	58
Obrázek 48: Iontové membránové proudy jako odezva na sekvenci obdélníkových napěťových impulsů	58

Seznam tabulek

Tabulka 2: Počáteční hodnoty vybraných proměnných[11].....	34
Tabulka 1: Přehled řešitelů diferenciálních rovnic v programu Matlab[]	34
Tabulka 3: : Koncentrace iontů použitých v modelu[6][11]	35

Úvod

Elektrofyzologie doznala za posledních padesát let velkého rozvoje. Získání poznatků o jevech a dějích probíhajících na izolovaných buňkách je důležité pro několik odvětví lékařství, jako je například vývoj léků. Informace o elektrických vlastnostech na izolovaných buněčných membránách jsou získány různými druhy měření, které jsou v této práci rozebrány. Všechny poznatky o elektrofyzilogie buněk daly vzniknout matematickým modelům, které ještě dále prohlubují znalosti získané pomocí experimentálních měření. Všechny tyto informace nám pomáhají objasnit principy o fungování našeho těla.

Tato práce je rozdělena do šesti kapitol. V kapitole první se seznamujeme se základními bioelektrickými jevy a buněčnými strukturami, které jsou zodpovědné za vznik těchto jevů.

V další části je rozebráno, jakým způsobem lze matematicky nahradit respektive matematicky modelovat buněčnou membránu. Dále se zde seznámíme s historickým rozvojem tohoto buněčného modelování. V této kapitole je popsán matematický model, který v pozdějších kapitolách této práce slouží jako základ pro vytvoření programu simulující elektrofyzilogické experimenty.

Ve třetí kapitole jsou rozebrány dvě základní metody získávání informací o elektrických vlastnostech buněčné membrány. Z toho vychází další část, která představuje techniku patch clamp a její specifické prostředky měření elektrických vlastností izolovaných buněk.

Poslední dvě kapitoly jsou věnovány realizaci programu založeného na matematickém modelu a jsou zde popsány postupy k jeho vytvoření. Dále zde naznačen popis programu a jeho nastavení. V poslední kapitole jsou uvedeny výsledky tohoto programu, které jsou srovnány s literaturou.

1. Základy elektrofyziologie a bioelektrických jevů

Buňka je nejmenší jednotka živých systémů, která vykazuje všechny základní znaky života a je schopna samostatné existence. Dále je považována za základní strukturní jednotku a všechny živé organismy jsou z ní složeny [1]. Vzhledem k tomu, že nás zajímají především bioelektrické jevy vznikající na buňkách, je proto důležité se seznámit se strukturami, které hrají významnou roli při těchto jevech. Mezi tyto struktury patří buněčná membrána a vodné roztoky nacházející se ve vnějším (extracelulárním) a vnitřním (intracelulárním) prostředí, jejichž rozbor bude uveden dále v textu.

1.1 Rozbor vnějšího a vnitřního prostředí buňky

Intracelulární prostředí buňky, označované též jako cytoplazma, je významné pro samotnou existenci buňky. Z molekulárního hlediska je tento prostor disperzní systém obsahující analytické a koloidní složky a dále je tvořen tzv. cytoskeletálním systémem, který je tvořen speciálními tubulárními a vláknitými útvary[1].

Pro nás je ovšem důležité chemické složení prostředí, které se skládá ze čtyř základních složek, které jsou voda, anorganické a organické sloučeniny i biopolymery. Voda, která je hlavní složkou prostředí, jejíž obsah je asi 70-85% , má funkci rozpouštění anorganických i organických látek, dále se podílí na transportu látek a účastní se metabolických pochodů[7]. Anorganické látky vyskytující se v prostředí můžeme rozdělit na tři skupiny podle jejich zastoupení[1]. První skupinu tvoří uhlík, vodík, kyslík, dusík, fosfor a síra, což jsou prvky nejvíce zastoupené a zároveň velmi důležité pro život buňky. Druhá skupina je složena z prvků sodíku, hořčíku, chlóru, draslíku a vápníku, které jsou důležité pro určité fyzikální procesy. A nakonec třetí skupinu tvoří tzv. stopové prvky, kam patří fluór, bór, molybden, jód, křemík, železo, mangan, zinek a měď.

Některé z výše uvedených prvků vytváří elektrolyty, což jsou sloučeniny disociující ve vodě na ionty a které jsou důležité při vzniku a vedení elektrického proudu v buňce. V intracelulárním prostředí se uplatňují především ionty draselné (K^+), chloridové (Cl^-), méně už poté ionty hořečnaté, hydrogenuhličitanové, síranové a fosforečnanové. Dále se ještě ve vnitřním prostředí uplatňují organické anionty (A^-). V extracelulárním prostředí se vyskytují především ionty sodné (Na^+) a vápenaté (Ca^{2+})[2] [11]. Mezi ionty, které mají významnou roli při elektrických dějích na buňce, patří výše zmíněné ionty draselné, chloridové, sodné a

vápenaté, pro které platí následující vztahy zobrazující koncentrační rozdíly v intracelulárním a extracelulárním prostředí

$$[Na^+]_e \gg [Na^+]_i, [K^+]_e \ll [K^+]_i, [Ca^{2+}]_e \gg [Ca^{2+}]_i, [Cl^-]_e \ll [Cl^-]_i. \quad (1)$$

1.2 Rozbor buněčné membrány

Základní vlastností buněčné membrány je oddělení vnějšího a vnitřního prostředí buňky, zajištění výměny látek, energií i informací mezi nitrem buňky a okolím[2]. Ve středu našeho zájmu se ocitají membrány u tzv. vzrušivých (excitabilní) buněk. Základní vlastností těchto buněk je schopnost generovat elektrické impulsy, označované jako akční napětí. Tato schopnost generovat elektrické impulsy je vlastností membrán. K pochopení bioelektrických dějů je proto nutné znát strukturu a vlastnosti buněčných membrán.

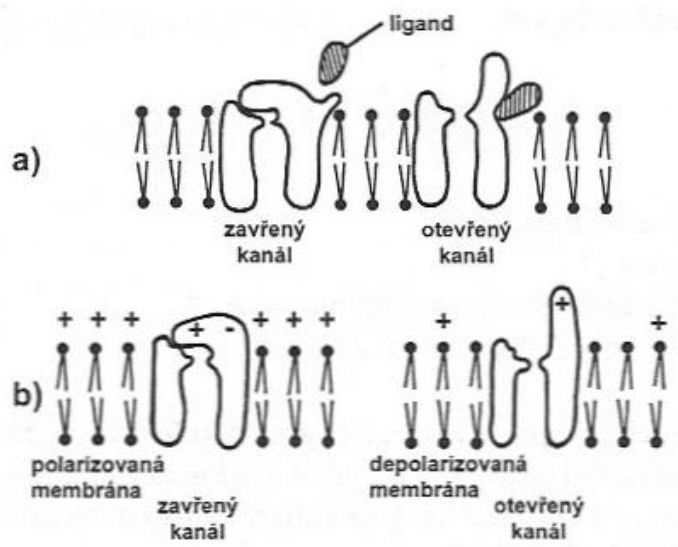
Buněčná membrána je nadmolekulový útvar, který je tvořený elektricky nevodivou tenkou dvojvrstvou lipidů se zabudovanými různými typy proteinů. Složky tvořící tuto dvojvrstvu jsou fosfolipidy a cholesterol[1]. Základní význam cholesterolu spočívá ve vyplnění prostoru mezi jednotlivými molekulami fosfolipidů. Molekuly fosfolipidů odpovídají tyčinkovitým útvarům délky přibližně 3nm, které se skládají z elektricky nabitě polární hlavičky a dvou nepolárních hydrofobních řetězců mastných kyselin[7]. Fosfolipidové molekuly tvoří v membráně dvojvrstvu, kde hydrofobní řetězce směřují proti sobě a hydrofilní hlavičky do okolního prostředí. Kromě výše zmíněných útvarů jsou do membrány zabudovány bílkovinné makromolekuly, které plní různé specifické funkce membrány. Rozlišujeme dva typy membránových molekul. První typ jsou periferní bílkoviny nacházející se na povrchu membrány a splňující funkci enzymů a membránových receptorů. Druhým typem jsou bílkoviny integrální zabudované do lipidové dvojvrstvy. Z hlediska elektrických jevů tyto makromolekuly vytváří iontové kanály a přenašeče, které mají funkci transportních mechanismů, umožňující přenos iontů přes nevodivou fosfolipidovou membránu[8].

1.3 Struktura a funkce kanálů

Bílkovinné kanály zprostředkovávají komunikaci mezi oběma stranami buněčné membrány. Můžeme u nich rozpoznat, že jsou složeny z určitých funkčních částí polypeptidového řetězce, které procházejí celou membránou, a proto na jejich povrchu rozlišujeme část hydrofobní a hydrofilní. Kanály vytváří v membráně póry, kde dochází k transportu iontů. Tento transport nevyžaduje přísun energie, ale je selektivní, což znamená, že propouští jen určité druhy iontů[2]. Selektivita kanálu je zajištěna pomocí selektivního

filtru nacházejícího se u vnějšího vstupu, kde dochází k interakci mezi ionty a kanálovými bílkovinami. Tento filtr zajišťuje velikost propustnosti pro různé druhy iontů. Je nutné se zmínit, že selektivita není dokonalá, proto dochází k situacím, kdy kanály propouští i jiné ionty[1].

Vrátkovací systém je další složkou, která ovlivňuje funkci kanálu. Vrátkování znamená, že dochází k otevírání a uzavírání kanálů v důsledku konformační změny molekuly bílkoviny. Jedná se o náhodný proces, kde kanál prochází řadou uzavřených stavů a zpravidla jedním otevřeným. Existuje několik mechanismů, které rozhodují o stavu kanálu. Proto se setkáváme s napět'ovým vrátkováním (voltage gating), kdy ke změně konformace bílkovinné molekuly dochází v důsledku změny membránového napětí. Na tuto změnu napětí je citlivá určitá část kanálu nazvaná napět'ový senzor. Dále se můžeme pozorovat chemické vrátkování (ligand gating), kde po navázání ligandu na bílkovinnou molekulu dochází ke změně konformace. Kromě těchto dvou základních typů lze vypořizovat kombinované vrátkování chemické i napět'ové a mechanické vrátkování[1].

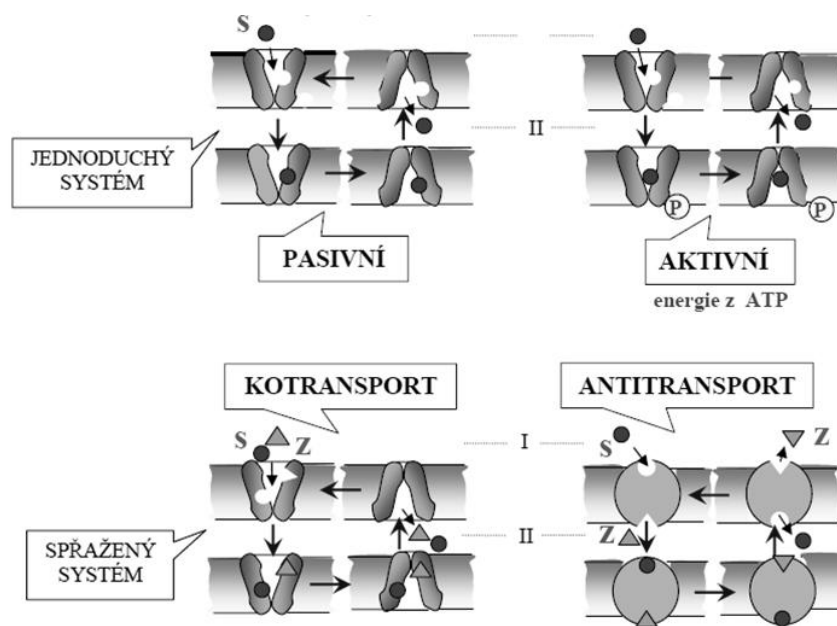


Obrázek 1: a) Chemické vrátkování, b) Napět'ové vrátkování[1]

Je důležité se zmínit o interakci určitých látek s kanály vysvětlující speciální účinky léků a toxických látek, které mohou být dále využity při studiu. Molekuly těchto látek se mohou navázat na kanál a změnit jeho funkci. Mezi takové látky patří blokátory, jejichž schopností je uzavírat kanály a lze je využívat při dalším studiu membránových kanálů[7]. Existují i látky, které naopak zvyšují propustnost membránových kanálů.

1.4 Struktura a funkce přenašečových systémů

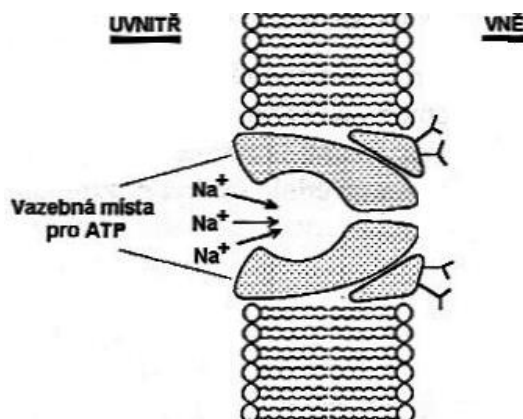
Druhým mechanismem výměny iontů mezi intracelulárním a extracelulárním prostředím jsou přenašečové systémy. Stejně jako kanály jsou přenašeče tvořeny bílkovinnými molekulami. Na rozdíl od kanálů je vazebné místo pro iont přístupné pouze z jedné strany membrány. Přenášený iont se tedy váže k přenašeči na jedné straně a na druhé straně je uvolňován. Dalším rozdílem mezi kanálem a přenašečem je energetická náročnost. Jak bylo uvedeno, kanály nevyžadují ke své práci přísun energie, jelikož přenos iontů probíhá spontánně z místa vyššího do místa nižšího elektrochemického potenciálu. V tomto případě hovoříme o tzv. pasivním transportu. U přenašečových systémů dochází k přesunu iontů proti tomuto elektrochemickému potenciálu, což vyžaduje přísun energie, která je získána při štěpení molekuly ATP. V tomto případě mluvíme o aktivním transportu[7]. Přenos iontů může být zprostředkován také pomocí transportu dvou druhů iontů označované jako kotransport a antitransport, které jsou zobrazeny na obr. 2. Celkový význam přenašečových systémů je ten, že zvyšují koncentrační rozdíly iontů a ustalují složení intracelulárního prostředí[2].



Obrázek 2: Způsoby přenosu iontů[2]

Mezi nejdůležitější přenašečové systémy patří Na/K a Na/Ca pumpa (obr. 3). Jak bylo zmíněno, tak hlavní úlohou těchto pump je udržet intracelulární prostředí konstantní. Kanály umožňují difúzi iontů sodíkových (Na^+) a vápenatých (Ca^{2+}) do buňky podle svého koncentračního spádu a pumpy mají za úkol tyto ionty vytěšňovat zpět z buňky. Princip Na/K pumpy je ten, že vytěšňuje 3 Na^+ ionty z buňky a zároveň vrací 2 K^+ ionty do buňky, čímž se

přenáší přes membránu i náboj. Druhá Na/Ca pumpa vytěsňuje Ca^{2+} ionty z buňky a současně poskytuje vstup 3 Na^+ iontů do buňky[8]. Stejně jako u předchozí pumpy dochází taktéž k přenosu náboje.



Obrázek 3: Schéma přenašečového systému[1]

1.5 Klidové membránové napětí

Výše zmíněné informace o buněčných membránách a strukturách v nich nacházejících se dávají vznik bioelektrickým jevům, které nyní budou rozebrány. Umístíme-li mikroelektrodu do intracelulárního a extracelulárního prostředí, kde se nacházejí rozpuštěné ionty a tvoří proto elektrolyty, naměříme zde určité elektrické napětí. Toto elektrické napětí na membráně vzniká z důvodu rozdílných elektrických potenciálů ve vnitř a vně buňky[2] [11]. Tento stav je zobrazen rovnicí

$$U_m = \varphi_i - \varphi_e, \quad (2)$$

kde U_m je membránové napětí, φ_i je potenciál intracelulárního prostředí a φ_e je potenciál extracelulárního prostředí. Velikost tohoto napětí se liší podle typů buněk, ale pohybuje se v rozmezí -90mV až -50mV[1][2]. Záporné znaménko je zvoleno podle konvence a značí, že vnitřní prostředí má záporný potenciál vzhledem k vnějšímu prostředí. O klidovém membránovém napětí (U_{mk}) hovoříme tehdy, když se buňka nachází v klidu.

Vznik membránového napětí lze vysvětlit několika možnými způsoby respektive rovnicemi. Jeden způsob je vysvětlen pomocí obecné Nernstovy rovnice

$$U_X = \frac{RT}{zF} \ln \frac{[X^z]_e}{[X^z]_i}, \quad (3)$$

kde U_X je rovnovážné napětí iontu X, R plynová konstanta, T absolutní teplota, F Faradayův náboj, z počet elementárních nábojů, které nese iont X^z a $[X^z]$ je koncentrace iontu

v extracelulárním a intracelulárním prostředí. Nernstova rovnice předpokládá, že je membrána propustná pouze pro jeden druh iontu a po jejích stranách se nachází tentýž elektrolyt. Vzhledem k tomu, že v po obou stranách membrány je rozdílná koncentrace iontů (1), tak se systém snaží dosáhnout rovnováhy pomocí vyrovnání koncentrace, takže ionty propouštěné membránou difundují do prostoru s menší koncentrací. Ionty opačně nabitě nemohou prostupovat přes membránu z důvodu zvolené propustnosti. Výsledkem tohoto dění je vznik elektrického pole v membráně působící proti toku difuzibilních iontů. V rovnováze se ustanoví nový potenciální rozdíl neboli membránové napětí, při němž proud protékající membránou je nulový. Jak lze vidět z obecné Nernstovy rovnice (3), rovnovážné napětí závisí na poměru koncentrací iontu X^Z . Přestože mezi prostředími vzniká elektrické napětí, oba roztoky zůstávají elektroneutrální, tj. koncentrace kladných i záporných iontů se rovná.

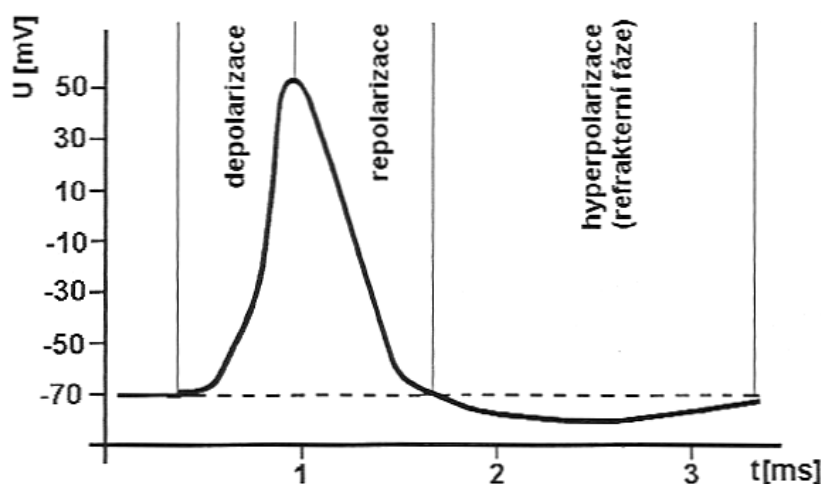
Další způsob vzniku klidového membránového napětí může být vysvětlena pomocí Goldmanovy rovnice[1]. Rozdíl oproti Nernstovi rovnici je předpoklad, že iontové roztoky jsou od sebe odděleny propustnou membránou. Napětí, které vzniká, již není rovnovážné, protože nevzniká při rovnováze systémů, nýbrž se jedná o napětí ustálené čili stacionární. Předpokládáme, že rozdíly v koncentracích iontů na obou stranách membrány budeme považovat za konstantní, čehož lze docílit neustálým aktivním přečerpáváním iontů proti svému elektrochemickému gradientu. Vzhledem k tomu, že na biologických membránách mají největší význam ionty draselné, sodné a chloridové, můžeme pro ně uvést Goldmanovu rovnici pro stacionární membránové napětí ve tvaru

$$U = \frac{2.3 \cdot R \cdot T}{F} \cdot \log \frac{P_{K^+} \cdot [K^+]_{EXT} + P_{Na^+} \cdot [Na^+]_{EXT} + P_{Cl^-} \cdot [Cl^-]_{INT}}{P_{K^+} \cdot [K^+]_{INT} + P_{Na^+} \cdot [Na^+]_{INT} + P_{Cl^-} \cdot [Cl^-]_{EXT}}, \quad (4)$$

kde P_{K^+} , P_{Na^+} a P_{Cl^-} jsou koeficienty propustnosti membrány pro ionty draselné, sodné a chloridové, $[K^+]$, $[Na^+]$, $[Cl^-]$ jsou koncentrace těchto iontů v extracelulární a intracelulárním prostředí. Goldmanova rovnice oproti Nernstově rovnici je pro popis membránových dějů přesnější, protože bere v úvahu, že je buněčná membrána propustná pro více iontů a disponuje mechanismem aktivního transportu, který udržuje nerovnoměrné rozdělení iontů.

1.6 Akční napětí

Akční napětí můžeme popsat jako rychlou změnu membránového napětí a význačnou vlastností je schopnost šířit se do okolního prostředí. Jak bylo řečeno, akční napětí vzniká u excitabilních (vzrušivých) buněk. Vznik tohoto napětí je podmíněn nadprahovým podrážděním, které může být vyvolán chemickými činiteli nebo malou změnou napětí na membráně. Průběh akčního napětí (obr. 4) nezávisí na velikosti nadprahového podráždění, ale lze pozorovat změny u různých excitabilních buněk.



Obrázek 4: Průběh akčního napětí[1]

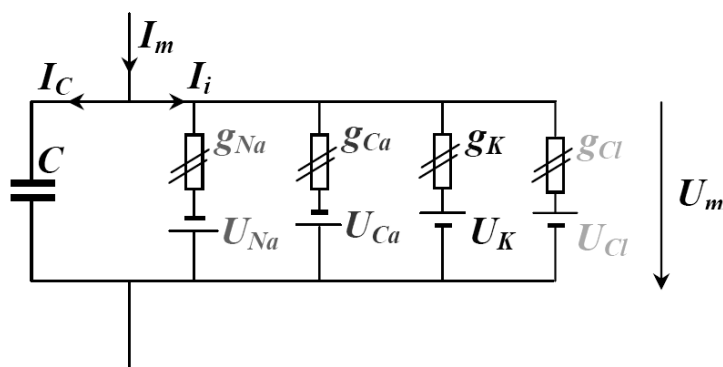
Akční napětí je podmíněno sodíkovou elektrogenézí[2]. Tato hypotéza byla vytvořena v roce 1949 sirem A. L. Hodgkinem a A. F. Huxleym. V jejich experimentech prováděných na axonu sépie *Loligo* bylo zjištěno, že proces vzniku akčního napětí začíná otevřením sodíkových kanálů, při kterém se zvýší vodivost membránového kanálu (g_{Na}) a sodíkové ionty (Na^+) začnou proudit z extracelulárního do intracelulárního prostředí. U některých typů buněk hrají významnou roli ionty vápenaté (Ca^{2+}) a proto se u nich můžeme setkat s kalciovou elektrogenézí. Princip akčního napětí spočívá v posunutí membránového napětí o 10 až 15 mV vlivem vnějšího podráždění, kdy poté dochází ke vtoku sodíkových iontů do nitra buňky a následně napětí spontánně překmitne do kladných hodnot na úroveň reverzního napětí pro sodíkové ionty (U_{Na}). Celý tento jev se označuje jako depolarizace. Téměř současně se zvyšuje vodivost draslíkových kanálů (g_K), kdy se draslíkové ionty vyplavují do extracelulárního prostředí. Následkem tohoto draslíkového vtoku dochází opět k překmitu napětí do záporných hodnot na velikost odpovídající reverznímu napětí pro draslíkové ionty (U_K). Tento jev je označován jako repolarizace. Někdy dochází k hyperpolarizaci, kdy napětí poklesne níže než je klidová hodnota. Časový interval, kdy je membrána hyperpolarizována, se označuje jako refrakterní fáze[1].

2. Modelování bioelektrických jevů

Součástí simulace elektrofyziologických experimentů je modelování bioelektrických jevů, protože slouží k hlubšímu poznání a porozumění dějů, které probíhají na buňce. Pomocí modelování můžeme zobrazovat průběhy na různých typech buněk a v současnosti je to velmi se rozvíjející se oblast, která si klade za cíl co nejpodrobnější popis všech mechanismů probíhající na buňkách.

2.1 Modelování buněčné membrány

K tomu, aby bylo možné tyto vlastnosti studovat, je zapotřebí sestavit náhradní schéma buněčné membrány. Jak již víme, membrána je tvořena dvojvrstvou fosfolipidů, která působí jako izolační vrstva oddělující dvě vodivá prostředí, a proto ji můžeme označit, jako kapacitu membrány C . Dále je nutné popsat schopnost kanálů propouštět ionty, což lze vyjádřit obecně vodivostmi g_x v sérii s napěťovými zdroji velikosti membránového rovnovážného napětí U_x , které můžeme získat z Nernstovy rovnice na základě známých koncentrací v intracelulárním a extracelulárním prostředí. Vzhledem k tomu, že reálná membrána je zároveň propustná pro více iontů, je nutné tuto skutečnost zohlednit v náhradním schématu přidáním dalších vodivostí a zdrojů napětí v závislosti na typu iontového kanálu na obr. 5.



Obrázek 5: Náhradní schéma reálné membrány[2]

Z obrázku je patrné, že membrána je propustná pro ionty sodné (Na^+), vápenaté (Ca^{2+}), draslíkové (K^+) a chloridové (Cl^-). Dále lze určit, že celkový membránový proud značený I_m je dán součtem kapacitního a iontového proudu[2] [11] podle vzorce

$$I_m = I_C + I_i, \quad (5)$$

kde I_C je kapacitní proud a I_i je iontový proud. Pro kapacitní proud platí následující vztah

$$I_C = C \frac{dU_m}{dt}, \quad (6)$$

kde C je kapacita membrány a U_m je membránové napětí. Celkový iontový proud je dán součtem proudů z jednotlivých iontových kanálů dle vztahu

$$I_i = I_{Na} + I_K + I_{Ca} + I_{Cl}, \quad (7)$$

Kde I_{Na} je sodíkový proud, I_K je draslíkový proud, I_{Ca} je vápníkový proud a I_{Cl} je chloridový proud.

Obecně je jednotlivý iontový proud dán součinem vodivosti kanálu a rozdílem membránového a rovnovážného napětí pro určitý iont[11], který lze vyjádřit vztahem

$$I_X = g_X(U_m - U_X), \quad (8)$$

kde g_X je vodivost kanálu, U_m je membránové napětí a U_X je rovnovážné napětí. Z těchto vztahů lze určit i klidové membránové napětí za předpokladu, že membránou neprotéká žádný náboj respektive proud, který lze vyjádřit

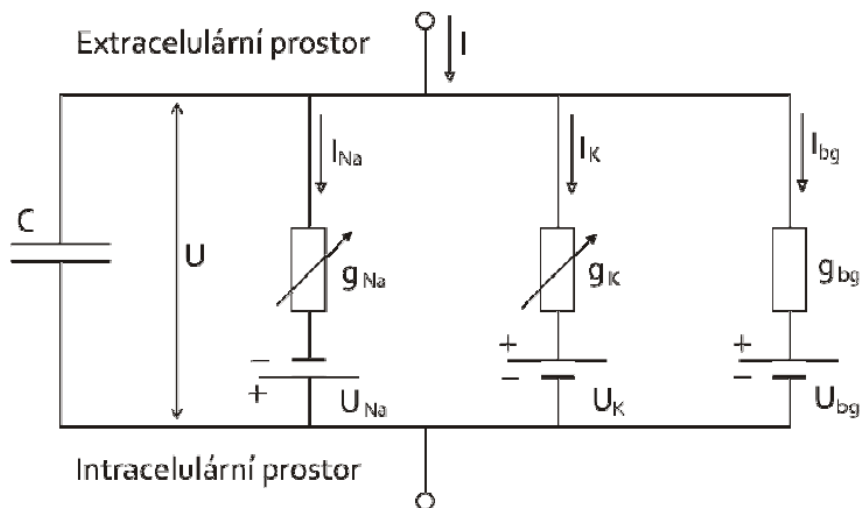
$$I_{ik} = 0, \quad (9)$$

kde I_{ik} je klidový iontový membránový proud. Za splnění podmínky (9) lze vyjádřit klidové membránové napětí U_{mk}

$$U_{mk} = \frac{g_{Na}U_{Na} + g_{Ca}U_{Ca} + g_KU_K + g_{Cl}U_{Cl}}{g_{Na} + g_{Ca} + g_K + g_{Cl}}, \quad (10)$$

kde g jsou vodivosti a U napětí pro ionty sodné, vápenaté, draslíkové a chloridové.

Základy modelování elektrické aktivity vychází z práce A. Hodgkina a A. Huxleyho realizované na axonu sépie *Loligo*[5]. Jedná se o model biologické membrány založený na přímém matematickém popisu experimentálních dat získaných měřením membránového napětí a membránových proudů, které popisují vznik akčního potenciálu a jeho tvar. Jedná se o soustavu nelineárních diferenciálních rovnic prvního řádu, kterými byly aproximovány naměřené průběhy vodivostí jednotlivých iontových kanálů a rovnice pro celkový proud procházející membránou[5]. Jejich náhradní schéma membrány zahrnuje kanály sodíkové, draslíkové a kanál později identifikován jako chloridový (viz obr. 6).



Obrázek 6: Náhradní elektrické schéma membrány podle Hodgkina a Huxleyho[5]

Zobecněné rovnice pro celkový membránový proud podle Hodgkina a Huxleyho[11] má tvar

$$I = C \frac{dU}{dt} + I_i. \quad (12)$$

Všechny proměnné by měly být známé z předchozího textu. Další rovnice popisuje bezrozměrnou veličinu y normovanou tak, aby nabývala hodnot v intervalu $<0;1>$, která popisuje pravděpodobnost nalezení kanálových vrátek v otevřeném stavu[9]. Tvar rovnice je

$$\frac{dy}{dt} = \frac{1}{\tau_y(U)} (y_\infty(U) - y), \quad (13)$$

kde τ_y je časová konstanta ukazující strmost změny veličiny y a y_∞ reprezentuje hodnotu y v ustáleném stavu pro určitou velikost membránového napětí[9]. Obě veličiny jsou funkcemi membránového napětí, které lze vyjádřit těmito vztahy

$$\tau_y(U) = \frac{1}{\alpha_y(U) + \beta_y(U)}, \quad (14)$$

$$y_\infty(U) = \frac{\alpha_y(U)}{\alpha_y(U) + \beta_y(U)}, \quad (15)$$

kde α_y a β_y jsou tzv. rychlostní konstanty napěťově řízené, které vyjadřují pravděpodobnost přechodu vrátek daného kanálu z otevřeného do uzavřeného stavu a naopak. Z těchto rovnic se poté vychází i u ostatních modelů buněk[5].

2.2 Vývoj modelování elektrické aktivity buněk

Jak bylo uvedeno výše, modelování elektrické aktivity buněk vychází z práce Hodgkina a Huxleyho realizované v padesátých letech minulého století. Zde byly popsány napětově řízené kanály pro sodík a draslík pro axon neuronu. Tento model umožňoval odhadnout tvar akčního potenciálu. Tato práce byla natolik přínosná v oblasti elektrofyzologie, že tvůrcům byla udělena v roce 1963 Nobelova cena.

V dalším vývoji modelování docházelo k rozšíření rovnic Hodgkina a Huxleyho, které popisovaly neuron, na srdeční buňky Purkyňových vláken. Tímto problémem se zabývali D. Noble a O. Hutter v letech 1960 až 1963, kteří objevili nové dva kanály – do buňky směřující draslíkový proud I_K a zpožděný usměrněný proud I_{K1} [5]. V roce 1975 prezentovali McCallister, Noble a Tsien svůj model pro rytmickou aktivitu Purkyňových vláken, který dále rozšiřoval předchozí model a obsahoval výstupní draslíkový proud I_{K2} a depolarizační proud I_{X1} . Další publikovaný model Beelera a Reutera z roku 1977 dokázal určit příčinu dlouhé plato fáze u komorových srdečních buněk a umožnil předpověď jejich oscilačního chování a frekvenční závislost akčního napětí. V tomto modelu byl zaveden subintracelulární prostor s proměnou koncentrací vápníkových iontů a objevil se nový proud I_{si} označený jako pomalý vápníkový proud. Další model uvedený DiFrancescem a Noblem v roce 1985 se zabýval změnou koncentrace vápníku a jeho pohyb do a ze sarkoplazmatického retikula.

V roce 1991 prezentovali svou práci Luo a Rudy[6], kteří vycházeli z modelu Beelera a Reutera, kde formulovali rychlostní konstanty pro sodíkový proud a přidali další časově závislý draslíkový proud. Z tohoto modelu se bude vycházet v této práci. Jejich úsilí vyvrcholilo v roce 1994, kdy prezentovali svůj model, který zahrnoval popis vápníkového proudu, popis výměnných přenašečových systému a pump a indukované uvolňování vápenatých iontů. Tento model se stal jedním ze základů pro většinu současných modelů.

V současnosti je hlavní cílem modelů detailní popis všech mechanismů podílejících se na elektrické a mechanické aktivitě srdečních buněk. Moderní kvantitativní modely obsahují rovnice popisující iontové kanály, dále přenašečové systémy a pumpy, zahrnují i vliv ligandů a změny koncentrace iontů v intracelulárním a extracelulárním prostředí buňky[5]. Jeden z nových matematických modelů zabývajících se těmito prvky je model od tvůrců Pandit S. V. et. al[10], který obsahuje popis sodíkového kanálu I_{Na} , L-typu vápníkového kanálu I_{CaL} , vápníkový nezávislý přechodný výstupní draslíkový proud I_t , ustálený výstupní draslíkový proud I_{ss} , dovnitř usměrněný draslíkový proud I_{K1} , hyperpolarizací aktivovaný proud I_f , a dále

popisuje sodíko-draslíkový výměnný proud I_{NaK} , vápníkový výměnný proud I_{CaP} , sodíko-vápníkový výměnný proud I_{NaCa} a mechanismu intracelulárního a sarkoplazmatického vápníku.

2.3 Model Luo Rudy

Součástí této práce je vytvoření buněčného modelu v programovém prostředí Matlab. Zpracován byl model Lua a Rudyho z roku 1991 s názvem A Model of the Ventricular Cardiac Action Potencial. Jedná se o matematický model membránového akčního potenciálu komorové buňky u savců. Tento model je založen na datech získaných z měření na jednotlivé izolované buňce nebo na měření jediného iontového kanálu s možností měnit hodnoty extracelulárního draslíku K_o [6].

Tento model je založen metodě, která vychází z obecných rovnic Hodgkina a Huxleyho (viz kapitola 2.1). Matematický model Lua a Rudyho je popsán soustavou obyčejných nelineárních diferenciálních rovnic prvního řádu vzhledem k času. Výpočet akčního potenciálu vychází z obdobné rovnice Hodgkina a Huxleyho pro výpočet membránového proudu (12) a nabývá tvaru

$$\frac{dV}{dt} = -\frac{1}{C} (I_i + I_{st}), \quad (16)$$

kde C je kapacita membrány, I_{st} je stimulační proud a I_i je součet všech iontových proudů vystupujících v modelu. Základem pro výpočet iontových proudů vystupujících v modelu Luo-Rudy jsou rovnice rychlostních konstant α_y a β_y , které jsou poté použity v rovnicích (13), (14), (15) a pomocí kterých získáváme časové konstanty τ_y , pravděpodobnosti otevřených vrátek y a ustálené hodnoty těchto pravděpodobností y_∞ , které jsou potřebné k výpočtu jednotlivých iontových proudů.

Celkem v tomto modelu vystupuje šest iontových proudů, jejich součet určuje celkový iontový proud daný vztahem

$$I_i = I_{Na} + I_{si} + I_K + I_{K1} + I_{Kp} + I_b, \quad (17)$$

kde I_{Na} je označen jako fast sodium current (rychlý sodíkový proud), I_{si} je slow inward current (pomalý vnější proud), I_K je time-dependent potassium current (časově závislý vnitřní draslíkový proud), I_{K1} je time-independent potassium current (časově nezávislý draslíkový proud), I_{Kp} je plateau potassium current (plató draslíkový proud), I_b je background current

(proud pozadí). Tři iontové proudy, jejichž společným znakem je, že jsou nezávislé na čase, z výše uvedených, tvoří proud total time-independent potassium current (celkový časově nezávislý draslíkový proud) určený vztahem

$$I_{K1(T)} = I_{K1} + I_{Kp} + I_b . \quad (18)$$

Fast sodium current I_{Na}

Tento proud vychází z modelu Beeler-Reuter, ale je vynechán parametr rovnovážného stavu pro vodivost. Vztah pro výpočet tohoto proud je

$$I_{Na} = \overline{g_{Na}} m^3 h j (V - E_{Na}), \quad (19)$$

kde g_{Na} je maximální vodivost pro sodíkový kanál, m lze označit za aktivační vrátka, h za rychlá inaktivační vrátka, j za pomalá inaktivační vrátka, V je membránové napětí a E_{Na} je rovnovážné napětí pro sodíkový kanál, který je určen Nernstovou rovnicí (3), kde obecné koncentrace extracelulárních a intracelulárních iontů jsou nahrazeny koncentracemi sodíkových kationtů Na^+ pro vnější a vnitřní prostředí. Pro výpočty proměnných m , h , a j se obecně používají rovnice (13), (14), (15), jejichž základem je výpočet rychlostní konstant α a β pro každou bránu. Tyto rovnice jsou uvedeny v práci Lua a Rudyho[6].

Slow inward current I_{si}

Rovnice pro proud I_{si} má tvar

$$I_{si} = \overline{g_{si}} d f (V - E_{si}), \quad (20)$$

kde g_{si} je maximální vodivost pro vápníkový kanál, d a f jsou vrátka, V je membránové napětí a E_{si} je rovnovážné napětí pro vápníkový kanál, které je závislé na koncentraci intracelulárních vápníkových kationtů a je dán vztahem

$$E_{si} = 7.7 - 13.0287 \ln([Ca^{2+}]_i), \quad (21)$$

kde $[Ca^{2+}]_i$ je koncentrace intracelulárních vápenatých kationtů.

Time-dependent potassium current I_K

Tento proud je kontrolován časově závislými aktivačními vrátky x a časově nezávislými inaktivačními vrátky X_i a jejich vztah je dán rovnicí

$$I_K = \overline{g_K} x X_i (V - E_K), \quad (22)$$

kde g_K je maximální vodivost, V je membránové napětí a E_K je rovnovážné napětí pro tento draslíkový proud. Maximální vodivost je určena rovnicí

$$\overline{g_K} = 0.282 \sqrt{\frac{|K|_o}{5.4}}, \quad (23)$$

kde $|K|_o$ je koncentrace extracelulárních kationtů draslíku K^+ . Podle tohoto vztahu pokud se zvýší koncentrace extracelulárních kationtů draslíku, dojde ke zvětšení maximální vodivosti pro tento proud. Rovnovážné napětí pro proud I_K má tvar obdobný jako Nernstova rovnice

$$E_K = \frac{R \cdot T}{F} \cdot \ln \frac{|K|_o + PR_{NaK} + |Na|_o}{|K|_i + PR_{NaK} + |Na|_i}, \quad (24)$$

kde R , T a F jsou konstanty, $|K|_o$ a $|K|_i$ jsou koncentrace pro extracelulární a intracelulární draslíkové kationty K^+ , $|Na|_o$ a $|Na|_i$ jsou koncentrace pro extracelulární a intracelulární sodíkové kationty Na^+ a PR_{NaK} je propustný poměr mezi sodíkovými a draslíkovými kationty.

Time-independent potassium current I_{K1}

Tento draslíkový proud obsahuje pouze jednu proměnnou $K_{1\infty}$, jehož časová konstanta je dost malá, a jedná proměnou v ustáleném stavu. Rovnice nabývá tvar

$$I_{K1} = \overline{g_{K1}} K_{1\infty} (V - E_{K1}), \quad (25)$$

kde g_{K1} je maximální vodivost a má tvar

$$\overline{g_K} = 0.6047 \sqrt{\frac{|K|_o}{5.4}}, \quad (26)$$

kde V je membránové napětí a E_{K1} je rovnovážné napětí pro tento proud určené Nernstovou rovnicí (3), kde vystupují koncentrace extracelulárních a intracelulárních draslíkových kationtů.

Plateau potassium current I_{Kp}

Tento proud se uplatňuje během fáze plató při akčním potenciálu srdeční buňky. Rovnovážné napětí pro tento proud je shodné s rovnovážným napětím pro proud I_{K1} a platí

$$E_{Kp} = E_{K1}. \quad (27)$$

Proud I_{Kp} je dán rovnicí

$$I_{Kp} = 0.0183 K_p (V - E_{Kp}), \quad (28)$$

kde V je membránové napětí.

Background current I_b

Tento proud je lineární funkcí membránového napětí V a je dán rovnicí

$$I_{Kp} = 0.03921(V + 59.87). \quad (29)$$

3. Metody měření signálů na buňce

Sestavení veškerých diferenciálních rovnic a z nich vytvořené modely předchází experimentální získávání dat. Ve středu našeho zájmu je především získávání proudově – napěťových charakteristik buněčné membrány, které se mohou měnit v závislosti na typu buňky nebo na vlivu různých látek působících na membránu. Jako hlavní metody určené pro získání experimentálních dat a z nich potřebných charakteristik se používají dvě základní metody current clamp (metodou vnuceného proudu) nebo voltage clamp (metodou vnuceného napětí)[2].

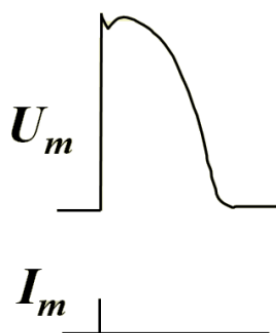
K prvním měření docházelo na velkých axonech sépie *Loligo*, kde bylo možné vsadit kovovou elektrodu do nitra buňky. Této metody měření využili Hodgkin a Huxley a díky této technice mohli popsat děje probíhající na buněčné membráně axonu sépie *Loligo*. Nicméně vnořování velkých elektrod je prakticky nemožné u buněk menších rozměrů. Teprve až nástup skleněných mikroelektrod, který znamenal velký mezník v rozvoji elektrofyziologie, znamenal velké rozšíření možností měření elektrických dějů na buňce. Objev skleněných mikroelektrod je datován na rok 1949 a jeho autory jsou G. Ling a R. W. Gerard[2]. Skleněné mikroelektrody jsou v podstatě duté skleněné kapiláry, které se z jedné strany kuželovitě zužují až k průměru 100 nm a jsou vyplněné vhodným roztokem, který je svým složením podobný vnitřnímu prostředí buňky. O elektrické spojení s měřicí soustavou se stará Ag/AgCl elektroda[3][4]. Vhodnou kombinací určitých faktorů při výrobě lze dosáhnout rozmanitých vlastností těchto elektrod, o kterých bude dále pojednáno v dalších kapitolách.

3.1 Current clamp

Current clamp neboli metoda vnuceného proudu pracuje na principu zavádění elektrického impulsu do buňky a sledování napěťové odezvy buněčné membrány. Tato metoda se používá u měření, kdy chceme zjistit informace o akčním potenciálu, který je buzen krátkým nadprahovým proudovým impulsem. Tato technika slouží ke studiu napěťové odezvy buňky na vstup elektrického proudu do buňky.

Jak bylo uvedeno v kapitole 1.5, klidové napětí na membráně se pohybuje v rozmezí -90mV až -50mV v závislosti na typu buňky. K tomu, aby došlo ke změně napětí a následně k průběhu akčního potenciálu, je potřeba zavést do buňky elektrický stimulační impuls. Jako stimulační impuls se používají krátké pozitivní nebo negativní proudy, které mají tvar pulsů

nebo krátkých obdélníkových (pravoúhlých) impulsů. Tyto impulsy musí být dostatečné velké k tomu, aby změnili klidové membránové napětí směrem ke kladným hodnotám a následně došlo ke vzniku akčního potenciálu. Vnucený stimulační impuls a následná vznik akčního napětí je zobrazen na obr. 7



Obrázek 7: Metoda vnuceného proudu (current clamp)[2]

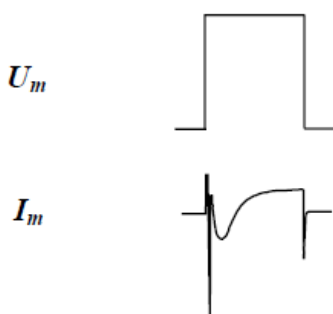
3.2 Voltage clamp

Metoda vnuceného napětí je využívána častěji, protože dává lepší informace o vlastnostech buněčné membrány[6]. Tato metoda především umožňuje měření velikosti iontových proudů v závislosti na velikosti nastaveného napětí (viz obr. 8) a studium proudové – napěťových charakteristik. Princip metody spočívá v připojení membrány na zdroj napěťových impulsů a sledování proudové odezvy. Této metody se využívá především u iontových kanálů, které jsou napěťově řízeny. Metoda vnuceného napětí byla vytvořena K. Colem a G. Marmountem v roce 1940 tedy ještě před zavedením mikroeletrod. Dále byla tato metoda zdokonalena Hodgkinem a Huxleym, kteří ji využili při experimentech na axonu sépie *Loligo*.

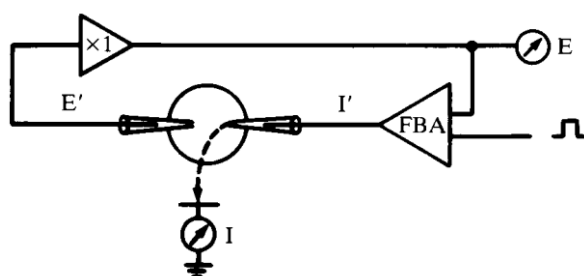
Existuje několik možností měření pomocí voltage clamp techniky využívající dvě (obr. 10) nebo pouze jednu mikroeletrodu (obr. 11). Při použití dvou elektrod je jedna použita na měření transmembránového napětí proti zemnicí elektrodě. Druhá mikroeletroda, která je připojena na zdroj napětí, je nastavena na určité řídicí napětí, které je na buněčné membráně udržováno. Mezi jedoelektrodovou techniku patří technika patch clamp, která má velký význam při měření elektrických signálů na buněčné membráně a bude mu věnována další kapitola.

Při metodě voltage clamp můžeme použít různé druhy napěťových impulsů. Nejčastěji se používají impulsy obdélníkové[6][12]. Při těchto impulsech získáváme informace o membránovém proudu (obr. 8). K tomu, aby došlo ke sledování membránového proud, musí být maximální vnucené napětí dostatečně vysoké, které bude mít parametry nadprahového podráždění. Sledovaný membránový proud je složený z jednotlivých iontových proudů nacházejících se v buněčné membráně. Kromě těchto iontových proudů se při použití obdélníkového impulsu vyskytuje i proud kapacitní, který se objevuje na začátku a na konci impulsu a částečně ovlivňuje měření[12]. Kromě obdélníkových napěťových impulsů lze dále použít impulsy s pilovitým průběhem označené jako ramp pulsy. Průběhy těchto ramp pulsů mohou být klesající nebo stoupající. Dále se ještě využívají impulsy skokové, které například obsahují více obdélníkových impulsů o různých velikostech a jsou postupně vnucovány buňce.

Metoda vnuceného proud nám umožňuje sledovat celkový membránový proud, který je dán součtem jednotných iontových proudů. Pokud chceme získat informace o jednotlivých iontových proudech, používají se specifické látky označené jako blokéry (kapitola 1.3). Tyto látky snižují propustnost určitých kanálů, což má za následek snížení vodivosti iontových kanálů a potlačí specifické iontové proudy. Tyto látky napomáhají k lepšímu studiu iontových proudů.



Obrázek 8: Metoda vnuceného napětí (voltage clamp)[2]



Obrázek 9: Schéma metody voltage clamp se dvěma elektrodami[12]

3.3 Patch clamp technika

Jak již bylo řečeno, tato technika je zdokonalená metoda vnuceného napětí využívající jednu mikroelektrodu. Vývoj této techniky probíhal v 70. a 80. letech minulého století a jejímu tvůrci jsou E. Neher a B. Sakmann[3], kteří byly za svou práci na této technice odměněni Nobelovou cenou v roce 1991. Další významný vývoj nastal po zveřejnění práce O. P. Hamilla a A. Martyho, která rozvinula patch clamp techniku do stávající podoby.

Tato technika umožňuje v režimu voltage clamp pozorovat iontové proudy procházející celou buněčnou membránou nebo pouze z malého úseku membrány (anglicky označen jako patch), který se vytvořil u špičky skleněné mikroelektrody[2]. V některých případech umožňuje sledování pouze jediného iontového kanálu, jehož výsledkem stochastický impulzní signál, který prochází náhodnými přechodnými stavy. Tyto stavy jsou buď vodivé, pokud je iontový kanál otevřen, nebo nevodivé v případě, kdy je kanál zavřen. Pravděpodobnost toho, že je kanál otevřený nebo zavřený, záleží na přiloženém membránovém napětí. Tento způsob měření se používá u kanálů, které jsou napětově řízeny (voltage gating). Nicméně techniku patch clamp lze použít i u chemicky řízených kanálů (ligand gating), kdy dochází k určité změně měření a je možné měnit složení roztoků použitých u měření, které ovlivňují stavy chemicky řízených kanálů. I když lze pomocí vhodného užití rozměrů skleněné mikroelektrody zajistit, že kousek membrány bude obsahovat jenom jeden iontový kanál, tak se v některých případech používají speciální látky označené jako specifické blokátory, které potlačí vodivost ostatních kanálů.

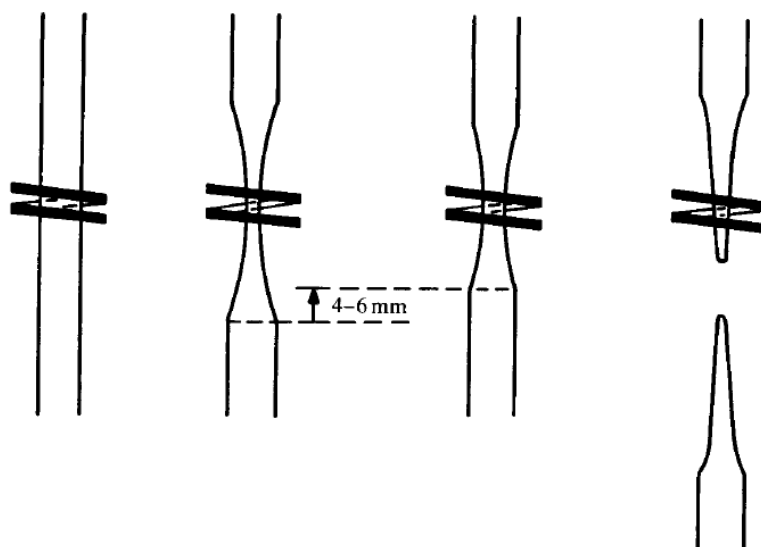
Princip této metody je elektrická izolace malého kousku membrány od zbytku membrány a záznam iontových kanálů respektive proudů, které se nacházejí v tomto kousku. Patch clamp záznamová technika využívá skleněnou mikroelektrodu určitých parametrů, která je tlačena proti buněčné membráně. Poté dochází k aplikaci podtlaku, což má za následek vytvoření pevného a vysoko odporového přilnutí membrány ke stěnám skleněné pipety, který je velmi důležitý při měření iontových kanálů. To je způsobeno přilnavostí fosfolipidů, které tvoří buněčnou membránou, ke skleněnému povrchu mikroelektrody. Vytvořené spojení mezi skleněnou pipetou a membránou dosahuje odporu 10 GΩ až 100 GΩ[3]. Tento vysoký odpor záleží na opatřeních udržující čistotu skleněné pipety a způsobu přisátí membrány k pipetě. Vysoký odpor spojení skleněné pipety a buněčné membrány je nazýván anglicky gigaseal[3][4]. Vzniklý vysoký odpor velmi výrazně snižuje šum v pozadí záznamu iontových kanálů, a proto umožňuje zlepšení v rozlišení u těchto záznamech. Dále je toto spojení velmi mechanicky stabilní, což je důležité u některých variant patch clamp

techniky. Různé varianty patch clamp techniky vznikly na základě potřeb výzkumníku studovat struktury a dále budou rozvinuty v dalším textu.

Skleněná mikroelektroda

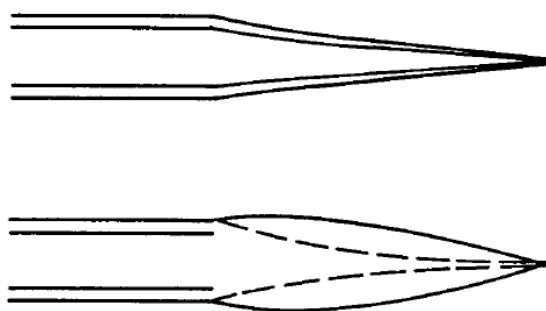
Mikroelektrody u techniky patch clamp jsou velmi důležité, protože zajišťují spojení s buňkou a spolu s buněčnou membránou vytváří těsné spojení označené jako gigaseal, které je velmi důležité při měření. Vliv na vysoký odpor tohoto spojení má chemické složení skleněné kapiláry. Existuje několik typů skleněných kapilár lišící se svými vlastnostmi, které musí být zváženy před výběrem, aby měření bylo co nejpřesnější. U skleněných mikroelektrod nás zajímá především schopnost vytvořit požadované rozměry a tvary, přídavek kovů mající vliv na měření a redukce šumu při měření. Kromě výběru typu skleněné kapiláry je dále důležité její další zpracování, které se skládá ze tří částí. V první části dochází k tažení kapilár, ve druhé části dochází k její povrchové úpravě a ve třetí části dochází k tepelnému vyleštění. Typy kapilár a jejich zpracování bude teď rozebráno.

V první části zpracování dochází k úpravě skleněné kapiláry tzv. tažením, kdy se uprostřed tato kapilára zahřívá ke svému tavnému bodu a je řízenou silou protahována až k přetržení za vzniku dvou identických kapilár (viz obr. 10). K této výrobě se používá měkké flintové a pyrex borosilikátové sklo[4]. Flintové sklo se taví při nižších teplotách, což umožňuje lepší manipulaci při výrobě. Oproti borosilikátovému sklu vytváří více stabilní spojení s buněčnou membránou. Nicméně borosilikátové sklo se standartně používá při výrobě skleněných mikroelektrod především kvůli lepším elektrickým vlastnostem, které snižují šum při měření. Výroba skleněných pipet se skládá ze dvou fází nebo více fází podle potřeby o dosažení co nejmenšího elektrického odporu mikroelektrody. Používá se vertikální tahač mikrokapilár, který obsahuje standardní žhavicí cívku. Postup výroby při tažení je ten, že v první fázi dochází ke ztenčení pipety v délce 7 – 10mm a získání průměru minimálně 200 μ m. Ve druhé fázi dochází k přetržení a k získání dvou identických mikrokapilár, které se kuželovitě zužují až ke špičce, která může mít průměr menší než 1 μ m. Pro flintové sklo lze použít následující nastavení, kdy v první fázi se nastaví proud na 19A. Po vycentrování kapiláry se ve druhé fázi použije proud 12A. Výsledkem je mikrokapilára s koncovým průměrem 1 μ m. U borosilikátového skla se použije nastavení vyšší a to 24A v první fázi a 15A v druhé fázi, jehož výsledkem je mikropipeta s tlustší stěnou u špičky[3].



Obrázek 10: Výroba skleněných mikrokapilár[4]

Ve druhé části zpracování skleněné mikroelektrody dochází k její povrchové úpravě. Tato úprava se provádí proto, aby došlo k redukci kapacitance, která se vytváří mezi mikrokapilárou a roztokem, a vytvoření hydrofobního povrchu. Pro povrchovou úpravu se používá inertní, hydrofobní, průhledný elastomer nazvaný jako Sylgard[3]. Aplikuje se na zužující se část mikrokapiláry až co nejbližší ke špičce, ale přibližně 50 μ m od konce kapiláry již pokrytá být nesmí (viz obr. 11). Kromě Sylgardu se dají použít i jiné látky jako například Sigmacote nebo Parafilm, které vyžadují jiný postup aplikace. Tato povrchová úprava není vždy vyžadována u mikroelektrod, které jsou použity k vytvoření pevného spojení gigaseal, ačkoliv snižuje šum při měření.



Obrázek 11: Mikrokapilára nepokryta (horní) a pokryta látkou Sylgard (spodní)[4]

V poslední třetí části dochází k tepelnému vyleštění skleněné mikrokapiláry. Význam této úpravy je ve vytvoření hladšího povrchu skleněné kapiláry. K této tepelné úpravě se používá drát z platiny a iridia, se kterým je manipulováno tak, aby se dostal do blízkosti

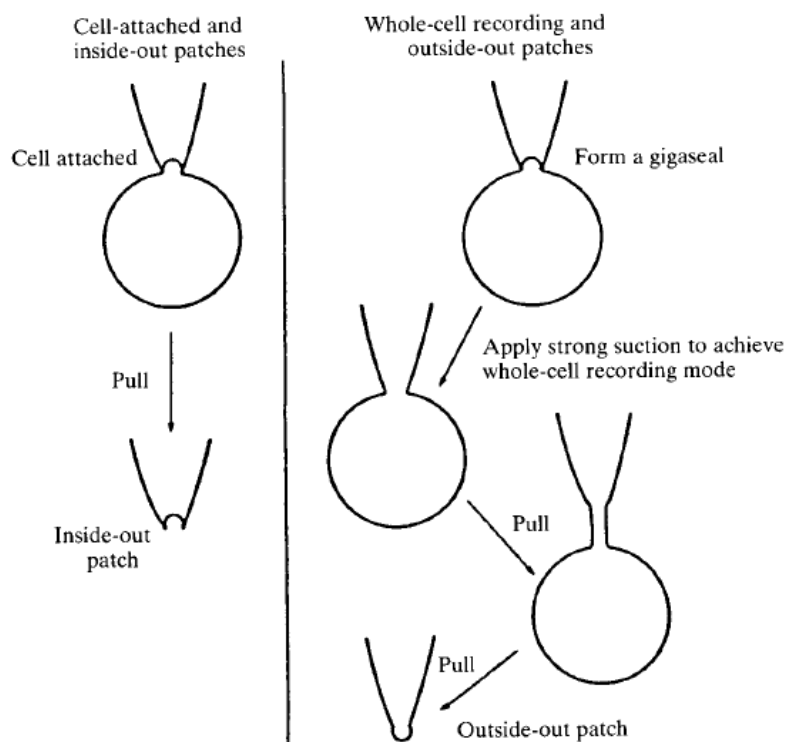
skleněné mikrokapiláry. Ztmavení skleněné stěny indikuje, že dochází k úpravě povrchu. Je-li mikrokapilára upravena pomocí Sylgardu, doporučuje se, aby tepelná úprava proběhla co nejdříve po nanesení látky. Poslední krok před použitím mikroeletrody je její očištění, které probíhá ponořením do metanolu a aplikací krátkého tlaku do vnitřního prostoru mikrokapiláry.

Aby se z mikrokapilár staly mikroeletrody, musí být naplněny elektrolytem, do něhož se zanoří tenký drátek, obvykle stříbrný opatřený vrstvou AgCl pro zamezení polarizace. Plnění mikrokapiláry roztokem může být provedeno několika způsoby podle typu mikrokapiláry. Mohou se plnit injekční stříkačkou v případech, kdy je rozměr špičky větší nebo u mikrokapilár, které obsahují menší kapiláry zavedené až ke špičce.

Když je skleněná mikroeletroda vytvořena, je vsazena do držáku, který zajišťuje elektrické spojení mezi mikrokapilárou a BNC konektorem zesilovače, a dovoluje aplikaci tlaku nebo sání do vnitřní části mikrokapiláry. Tento držák je tvořen vnitřními částmi, které jsou vyrobeny například z Teflonu. Vnitřní část je chráněna kovovým víkem. Dále obsahuje otvor, kterým je možné aplikovat tlak nebo sání a výše zmíněný BNC konektor.

3.4 Varianty techniky patch clamp

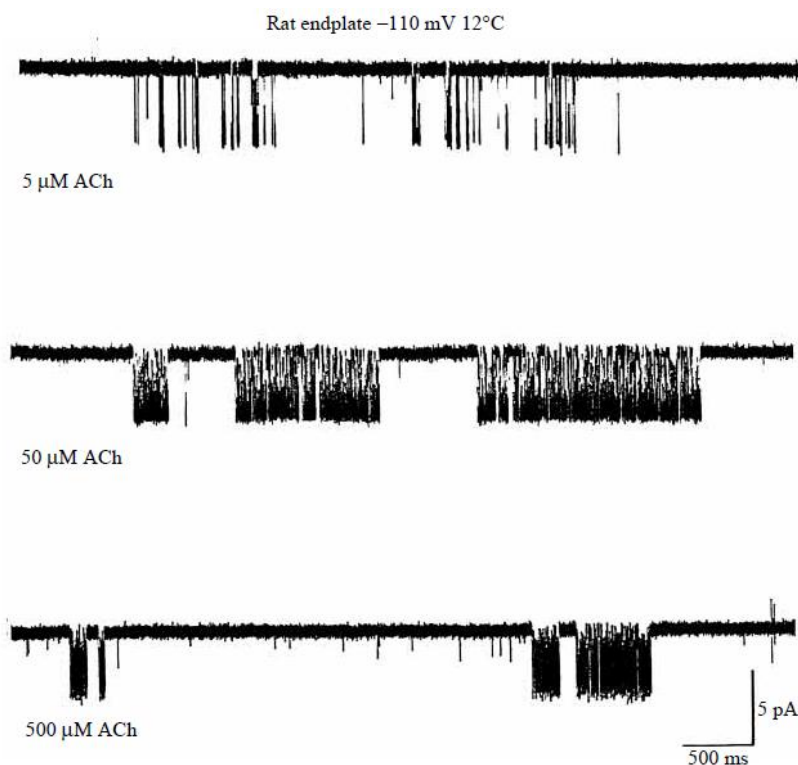
Jak bylo zmíněno, kontakt mezi buněčnou membránou a skleněnou mikroeletrodou je elektricky i mechanicky velmi stabilní. Toto spojení umožňuje několik variant měření podle toho co je cílem experimentu. Mezi tyto varianty patří techniky inside-out patch a outside-out patch[4], které vznikají při odstranění kousku membrány ze zbytku buňky. Obě tyto techniky lze označit jako excised patch metody a společně s technikou zvanou cell-attached patch umožňují studium chování a měření individuálních iontových kanálů na kousku membrány přichyceny k mikroeletrodě. Dále lze u excised patch technik studovat vliv změny iontových roztoků a působení různých léčiv na iontové kanály v membráně. Další používané techniky jsou whole-cell patch a perforated patch, které umožňují studium elektrické chování celé buňky. Všechny uvedené techniky budou podrobně rozebrány v dalším textu.



Obrázek 12: Schéma různých variant patch clamp techniky[4]

Cell attached patch technika

Při této technice je mikroelektroda dokonale přisáta k povrchu buněčné membrány a se zbytkem membrány zůstává zachován. Tento způsob metody dovoluje registrovat proudy procházející jedním kanálem. Lze získat charakteristiky jak z napěťově řízených kanálů tak i z kanálu chemicky řízených, které jsou ovládány speciální signální molekulou zvanou ligand. K tomu, aby bylo možné ovládat chemicky řízené kanály, je nutné tuto látku v určité koncentraci dodat do roztoku uvnitř mikroelektrody a chemicky řízený kanál se musí nacházet v úseku, který je přichycen k mikroelektrodě (viz obr. 13). Jako ligand se často používá acetylcholin[4]. Nevýhodou tohoto měření je, že aby bylo možné dosáhnout dostatečného množství měření k vytvoření určité charakteristiky, je nutné měnit koncentraci ligandu v mikroelektrodě. Tato změna koncentrace vyžaduje postupné měření na dalších buňkách. Napěťově řízené kanály jsou ovládány napětím, které je nastaveno uvnitř mikroelektrody. Toto napětí může být v průběhu měření měněno, aniž by bylo nutné měření na jiných buňkách.



Obrázek 13: Záznam jednobuněčného proudu aktivovaný acetylcholinem[4]

Inside-out patch clamp technika

Jakmile je vytvořeno pevné spojení nazvané gigaseal mezi mikroelektrodou a membránou, dochází k rychlému odtržení elektrody od buňky. Kousek membrány zůstává přichycený ke skleněné mikroelektrodě. V některých případech dochází k vytvoření dutiny u hrotu mikroelektrody, jehož vnější strana je v tomto případě nežádoucí a musí být odstraněna nebo narušena. Toho lze docílit několika způsoby. Jedna možnost je vystavení této dutiny krátce (1-2 s) vzduchovému-vodnímu rozhraní nebo roztoku (KCl) s nízkým obsahem Ca^{2+} . Další možnost narušení této dutiny je krátký kontakt kapky hexadekanu nebo parafinu[4]. Díky této technice je možné vystavovat intracelulární část membrány různým externím látkám. Tato metoda slouží ke studiu kanálů, které jsou ovládány vnitrobuněčným ligandem. Měření těchto charakteristik je zjednodušeno snadnou změnou koncentrací tohoto ligandu v externím roztoku. K větší stabilitě inside-out patch techniky přispívá, když je v koupacím roztoku aniont Cl^- nahrazen $(\text{SO}_4)^{2-}$ [3].

Outside-out patch clamp technika

Tato metoda se vychází z techniky whole-cell patch, kdy je po přisání odstraněn zbytek buňky. V tomto případě je nutné narušit vnitřní část dutiny, která brání měření. Toho

Lze dosáhnout opět roztokem KCl s nízkým množstvím Ca^{2+} . Dále lze předcházet tvorbě této dutiny mechanickým protržením útržku přichyceného k mikroelektrodě. Okraje tohoto útržku směřující mimo hrot elektrody se poté spojí a dochází k vytvoření kulovitého útvaru na špičce. Tímto postupem dojde k vystavení extracelulární části membrány směrem ven, zatímco intracelulární část směřuje dovnitř k elektrodě. I tady lze studovat proudy jednoho kanálu, za předpokladu, že je kulovitý útvar na špičce elektrody dostatečně malý. Při tomto měření se extracelulární část membrány vystavuje různým druhům roztoku o různých koncentracích, aniž by bylo nutné toto měření opakovat na jiné části. Toto je výhoda oproti technice cell attached patch. Na druhou stranu se objevuje několik nevýhod. U tohoto měření se vyskytuje vyšší hladina šumu, což může být způsobeno nižší odporem spojením gigasealů z důvodu mechanického narušení dutiny, která se po čase ustálí na hodnotě okolo $10\text{G}\Omega$ [4]. Vliv na zvětšení šumu může mít i zvětšení plochy útržku. V neposlední řadě je tato technika poměrně složitá a vyžaduje více kroků v postupu při vytváření.

Whole cell patch clamp technik

Jak již bylo zmíněno, tato technika se nepoužívá při studiu jednotlivých kanálů ale ke studiu všech kanálů v celé buňce. Po přisání mikroelektrody k povrchu buňky dochází k další aplikaci sání, které protrhne útržek membrány umístěné v pipetě. Toto protržení umožní elektrické zpřístupnění intracelulárního prostředí. Tato technika se používá u buněk menších rozměrů, které jsou v průměru menší než $30\mu\text{m}$ [3]. Roztok v mikroelektrodě se musí svým složením co nejvíce blížit složení intracelulárního prostředí. Nevýhodou této metody je, že po nějakém čase dochází k ovlivnění vnitřního prostředí buňky roztokem nacházejícím se v mikroelektrodě. Tento proces se označuje jako dialyzace.

Perforated patch technika

Tato metoda je variantou whole cell patch techniky. Místo protržení útržku membrány v mikroelektrodě se elektrický kontakt s intracelulárním prostředím získává za pomoci antibiotika, které jsou přidána do roztoku v mikroelektrodě. Antibiotika způsobí narušení buněčné membrány, tím že dochází k vytváření malých otvorů v této membráně. Tudiž výhoda této metody je nižší dialyzaci buňky oproti a whole cell patch metodě. Nevýhodou je nižší přesnost měření, protože velikost šumu je vyšší. Aplikace antibiotik má vliv na rychlost měření, které je prodlouženo z důvodu nutnosti čekat na perforaci membrány antibiotiky.

4 Realizace modelu Luo a Rudy v prostředí Matlab

Výsledkem této bakalářské práce je program realizovaný v programovém prostředí MATLAB verze R2007b s využitím grafického prostředí GUI (Graphical User Interface) sloužící k vytvoření uživatelského rozhraní. Název tohoto programu je Luo_Rudy_program a se skládá z 12 částí, kde hlavní funkcí je Luo_Rudy_program.m, který program spouští. Tento model zpracovává matematický model Lua a Rudyho z roku 1991[6]. Dále program obsahuje techniky měření metodou vnuceného proudu (current clamp) a vnuceného napětí (voltage clamp) použité na uvedený model s možností měnit intracelulární a extracelulární hodnoty koncentrace iontů uvedené v práci Lua a Rudyho a mechanismus účinku některých blokátorů. V následujících kapitolách bude představeno řešení modelu Lua a Rudyho v programovém prostředí MATLAB spolu s měřicími metodami a bude uveden popis aplikace Luo_Rudy_program.

4.2 Řešení modelu Luo a Rudy v programu MATLAB

Obsah modelu Luo a Rudy byl naznačen v kapitole 2.3. Jak bylo zmíněno, jedná se o matematický model membránového akčního potenciálu komorové buňky, ve kterém se vyskytuje celkem šest iontových proudů. Základem tohoto modelu je tedy výpočet akčního potenciálu podle vztahu (16), kde je celkový iontový proud I_i určen součtem jednotlivých iontových proudů (17) I_{Na} , I_{si} , I_K , I_{K1} , I_{Kp} a I_b . K výpočtu těchto proudů slouží jako základ rovnice rychlostních konstant α_y a β_y , ze kterých lze získat časové konstanty τ_y , pravděpodobnosti otevřených vrátek y a ustálené hodnoty těchto pravděpodobností y_∞ . Některé z těchto proudů jsou dále určeny vrátkovacími proměnnými, jejichž rovnice mají tvar diferenciálních rovnic prvního řádu. Hlavní řešení tohoto modelu spočívá v převedení rovnic uvedených v práci Lua a Rudyho do programového prostředí MATLAB.

Celkem 8 rovnic obsažených v modelu má tvar diferenciálních rovnic prvního řádu. Tyto rovnice slouží k výpočtu dynamických proměnných m , h , j , d , f a x . Další diferenciální rovnice patří k výpočtu membránového napětí V , ze kterého získáme průběh akčního membránového potenciálu. Poslední diferenciální rovnice slouží k výpočtu vápníkové absorpce (calcium uptake). Proměnné m , h , j jsou aktivační a inaktivační vrátka sloužící k výpočtu proudu I_{Na} (19), proměnné d a f slouží k výpočtu proudu I_{si} (20), proměnná x je užita při výpočtu proudu I_K (22). Diferenciální rovnice těchto proměnných mají následující tvary

$$\frac{dm}{dt} = \frac{(m_{\infty}-m)}{\tau_m}, \quad (30)$$

$$\frac{dh}{dt} = \frac{(h_{\infty}-h)}{\tau_h}, \quad (31)$$

$$\frac{dj}{dt} = \frac{(j_{\infty}-j)}{\tau_j}, \quad (32)$$

$$\frac{dd}{dt} = \frac{(d_{\infty}-d)}{\tau_d}, \quad (33)$$

$$\frac{df}{dt} = \frac{(f_{\infty}-f)}{\tau_f}, \quad (34)$$

$$\frac{dx}{dt} = \frac{(x_{\infty}-x)}{\tau_x}. \quad (35)$$

Diferenciální rovnice pro výpočet membránového napětí (16) byla zmíněna v kapitole 2.3. Poslední diferenciální rovnice pro výpočet vápníkové absorpce má tvar

$$\frac{d|Ca|_i}{dt} = -10^{-4}I_{si} + 0.07(-10^{-4} + |Ca|_i). \quad (36)$$

Poslední rovnice mění koncentraci intracelulárních vápenatých iontů, což se projevuje změnou rovnovážného napětí E_{si} (21), což ovlivňuje velikost proudu I_{si} .

V Matlabu lze soustavu diferenciálních rovnic řešit několika způsoby. Například lze použít různé metody jako je Eulerova nebo metoda Runge-Kutta. Matlab ovšem nabízí vlastní možnosti řešení diferenciálních rovnic. K řešení diferenciálních rovnic můžeme použít v programovém prostředí několik druhů řešitelů, ale vzhledem k tomu, že model Lua a Rudyho počítá s počátečními podmínkami (tabulka 2), je proto nutné zohlednit tuto věc při výběru řešitele. Počáteční hodnoty vybraných proměnných v tabulce 2 odpovídají počátečním podmínkám pro koncentrace iontů v extracelulárním a intracelulárním prostředí (tabulka 3). Celkem tedy můžeme použít při řešení modelu Lua a Rudyho 8 řešitelů, které jsou zobrazeny v tabulce 1.

Jako řešitel diferenciálních rovnic byla vybrána funkce ode15s. Jedná se o víceetapovou metodu založenou na numerických diferenčních formulích. Tento řešitel byl vybrán, protože splnil požadavky na přesnost a vyznačoval se poměrně značnou rychlostí při výpočtu rovnic během spuštění programu. Použití této funkce záleží na výběru měřicí techniky. Dochází zde k určité odlišnosti při použití pro metodu vnuceného proudu a pro metodu vnuceného napětí.

Tabulka 1: Přehled řešitelů diferenciálních rovnic v programu Matlab[]

Solver	Problem Type	Order of Accuracy	When to Use
ode45	Nonstiff	Medium	Most of the time. This should be the first solver you try.
ode23	Nonstiff	Low	If using crude error tolerances or solving moderately stiff problems.
ode113	Nonstiff	Low to High	If using stringent error tolerances or solving a computationally intensive ODE file.
ode15s	Stiff	Low to Medium	If ode45 is slow because the problem is stiff.
ode23s	Stiff	Low	If using crude error tolerances to solve stiff systems and the mass matrix is constant.
ode23t	Moderately Stiff	Low	If the problem is only moderately stiff and you need a solution without numerical damping.
ode23tb	Stiff	Low	If using crude error tolerances to solve stiff systems.

Tabulka 2: Počáteční hodnoty vybraných proměnných[11]

V_0	-84.3801107371
m_0	0.001713
h_0	0.982660523699656
j_0	0.989108212766685
d_0	0.00302126301779861
f_0	0.999967936476325
x_0	0.0417603108167287
$ Ca _0$	0.00017948816388306

Tabulka 3: : Koncentrace iontů použitých v modelu[6][11]

Druh iontu	Koncentrace v extracelulárním prostředí [mM]	Koncentrace v intracelulárním prostředí [mM]
Draslíkový (K^+)	5,4	145
Sodíkový (Na^+)	140	18
Vápníkový (Ca^{2+})	1.8	$1.8 \cdot 10^{-4}$

4.2 Realizace metody vnuceného proudu na model Luo a Rudy

Výše zmíněný postup realizace modelu Luo a Rudy v prostředí Matlab byl použit při realizaci metody vnuceného proudu (current clamp). Při této metodě dochází ke stimulaci buněčné membrány stimulačním proudem a výsledkem je získání akčního membránového potenciálu. Ve vztahu pro akční potenciál (16) vystupuje stimulační proud I_{st} , který lze v programu Matlab namodelovat, jelikož můžeme určit jeho průběh, který většinou má charakter jednotkového impulsu nebo krátkého obdélníkového impulsu, a lze ho do tohoto vztahu dosadit. Poté lze pro výpočet tohoto napětí použít v prostředí Matlab řešitele diferenciálních rovnic ode15s. Tato funkce je aplikována na část programu obsahující všechny matematické výpočty a proměnné obsažené v modelu Luo a Rudy včetně 8 diferenciálních rovnic prvního řádu zobrazených v předcházející kapitole. Způsob jakým se spouští tato funkce je zobrazen na obrázku 20. Podmínkou pro správné užití této funkce je definice počátečních podmínek (tabulka 2) pro proměnné V , m , h , j , d , f , x a Ca_i . Dále je nutné zadat rozsah doby měření, ze které si funkce automaticky určuje derivační krok. Po aplikaci funkce ode15s získáme hodnoty těchto proměnných, ze kterých lze získat informace o akčním potenciálu, iontových proudech a dalších proměnných obsažených v tomto modelu.


```

897
898 - IN = [V0 m0 h0 j0 e0 f0 x0 Ca_i0];
899
900 % Solver
901
902 - odefun = @Luo_Rudy_model_current_clamp;
903 - [Tm,OUT] = ode15s(odefun,[1 Tmax],IN);
904
905 - V = OUT(:,1);
906 - m = OUT(:,2);
907 - h = OUT(:,3);
908 - j = OUT(:,4);
909 - e = OUT(:,5);
910 - f = OUT(:,6);
911 - x = OUT(:,7);
912 - Ca_i = OUT(:,8);

```

Obrázek 14: Použití funkce ode15s pro metodu vnuceného proudu

4.3 Realizace metody vnuceného napětí na model Luo a Rudy

Podobný postup, jako byl použit v přecházející kapitole 4.2 pro metodu vnuceného proudu, je použit i při realizaci metody vnuceného napětí. Při této metodě, ale nezískáváme informace o akčním membránovém potenciálu a proto se při této metodě neuplatňuje diferenciální rovnice pro její výpočet (16). Proto se tato metoda použije na model Luo a Rudyho, který obsahuje 7 diferenciálních rovnic prvního řádu pro proměnné m , h , j , d , f , x a Ca_i . Metoda vnuceného napětí vyžaduje použít předem známý napěťový impuls, který je převeden do programu Matlab a dále je aplikován na model. Napěťový impuls může mít různé průběhy zmíněné v kapitole 3.2. Pro výpočet neznámých lze opět použít funkci ode15s. Kromě zmíněných počátečních podmínek pro proměnné nacházející se ve diferenciálních rovnicích je nutné určit, na rozdíl od metody vnuceného proudu, i pevný derivační krok výpočet. Aplikace funkce ode15s je zobrazena na obrázku 15. Je nutné podotknout, že tato aplikace se liší podle druhu napěťového impulsu, který chceme použít.

```

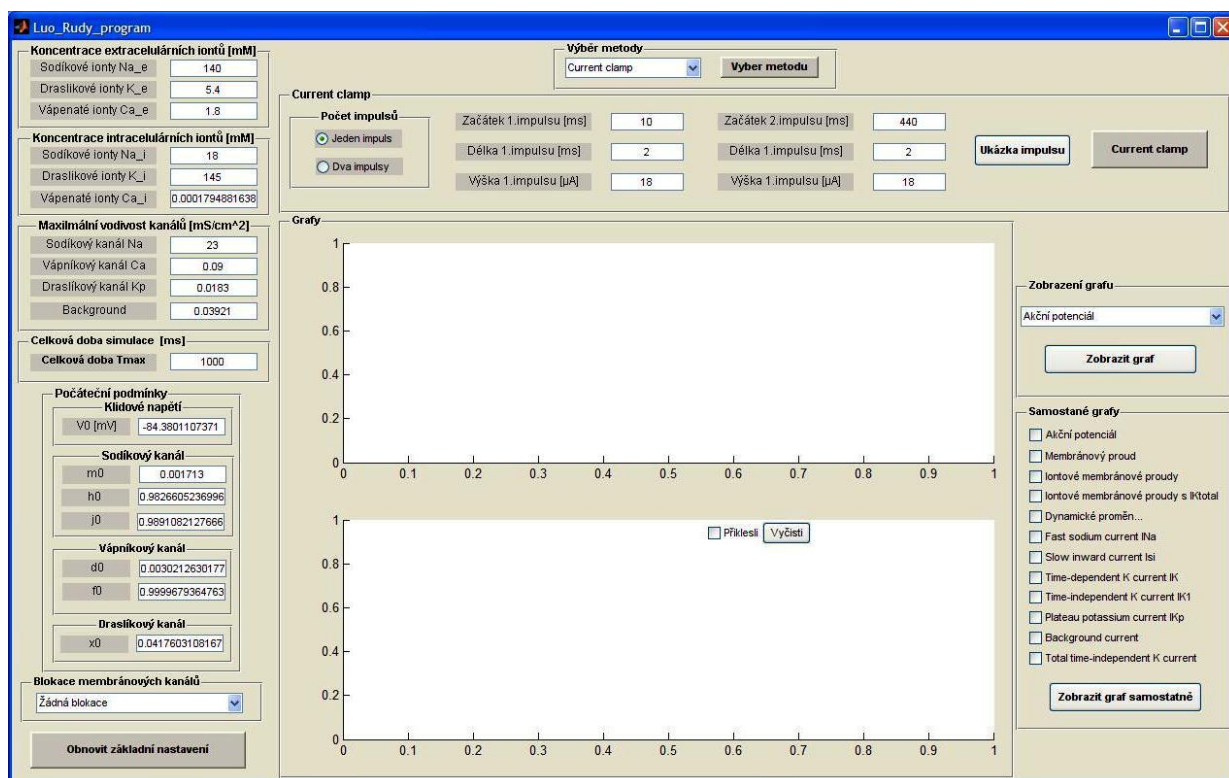
2024 - odefun = @Luo_Rudy_model_voltage_clamp;
2025 - [Tm,OUT] = ode15s(odefun,[1:1:Tmax],IN);
2026
2027 - m = OUT(:,1);
2028 - h = OUT(:,2);
2029 - j = OUT(:,3);
2030 - e = OUT(:,4);
2031 - f = OUT(:,5);
2032 - x = OUT(:,6);
2033 - Ca_i = OUT(:,7);

```

Obrázek 15: Aplikace funkce ode15s pro metodu vnuceného napětí

5 Luo-Rudy program

Grafické rozhraní vytvořené v Matlab GUI, které je určené pro ovládání programu, je uvedeno na obrázku 16. Celkem lze tuto aplikaci rozdělit na čtyři základní části, nastavení základních parametrů, výběr metody měření, nastavení zobrazení grafických výstupů a pole pro grafické výstupy.



Obrázek 16: Grafické rozhraní Luo_Rudy_program

5.1 Nastavení základních parametrů modelu

V této části lze nastavit základní parametry (obr. 17) pro výpočet podle modelu Luo a Rudy. V této části je možné měnit nebo zvolit následující parametry:

- Koncentrace extracelulárních iontů Na^+ , K^+ , Ca^{2+} v jednotkách [mM],
- Koncentrace intracelulárních iontů Na^+ , K^+ , Ca^{2+} v jednotkách [mM],
- Maximální vodivost kanálů v jednotkách [mS/cm^2],
- Celková doba simulace v jednotkách [ms],
- Počáteční podmínky,
- Blokace membránových kanálů,
- Obnovit základní nastavení.

Koncentrace extracelulárních iontů [mM]	
Sodíkové ionty Na _e	140
Drasíkové ionty K _e	5.4
Vápenaté ionty Ca _e	1.8

Koncentrace intracelulárních iontů [mM]	
Sodíkové ionty Na _i	18
Drasíkové ionty K _i	145
Vápenaté ionty Ca _i	0.0001794881638

Maximální vodivost kanálů [mS/cm ²]	
Sodíkový kanál Na	23
Vápníkový kanál Ca	0.09
Drasíkový kanál Kp	0.0183
Background	0.03921

Celková doba simulace [ms]	
Celková doba Tmax	1000

Počáteční podmínky	
Klidové napětí	
V0 [mV]	-84.3801107371
Sodíkový kanál	
m0	0.001713
h0	0.9826605236996
j0	0.9891082127666
Vápníkový kanál	
d0	0.0030212630177
f0	0.9999679364763
Drasíkový kanál	
x0	0.0417603108167
Blokace membránových kanálů	
Žádná blokáce	
Obnovit základní nastavení	

Obrázek 17: Nastavení základních parametrů

Koncentrace extracelulárních a intracelulárních iontů

Základní koncentrace extracelulárních a intracelulárních iontů vychází z práce Lua a Rudyho a je obsaženo v tabulce 2. Nastavení koncentrací je omezeno na interval 0-200 mM, kdy při jeho překročení se zpětně nastaví základní hodnota.

Maximální vodivost kanálů

Změna hodnoty maximální vodivosti je umožněna pouze u proudů I_{Na} , I_{si} , I_{Kp} a I_b . U ostatních proudů I_K a I_{K1} toto nastavení není možné z důvodu, že maximální vodivost pro tyto proudy je určena pomocí extracelulárních a intracelulárních koncentrací uvedených ve vztazích (23) a (26).

Celková doba simulace

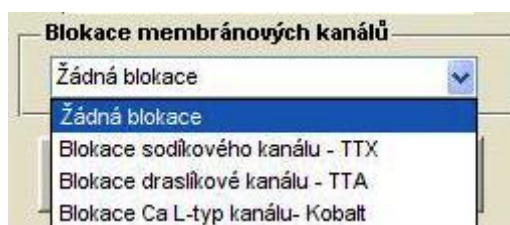
Celková doba stimulace určuje, pro jak dlouhý interval bude simulace trvat. Základní hodnota je nastavena na 1000ms.

Počáteční podmínky

Nastavení počátečních podmínek je důležité pro výpočet diferenciálních rovnic obsažených v modelu. Tyto podmínky lze určit u proměnných V , m , h , j , d , f a x . Při realizaci modelu byla zmíněna proměnná Ca_i , která určuje intracelulární koncentraci vápníkových kationtů Ca^{2+} a je proto umístěna v panelu pro nastavení koncentrací intracelulárních iontů. Výchozí počáteční podmínky jsou uvedeny v tabulce 3.

Blokace membránových kanálů

Blokace membránových kanálů umožňuje výběr, zda chceme při simulaci použít blokaci některého z kanálů. Tato funkce umožňuje blokaci sodíkového kanálu pomocí látky tetrodotoxin TTX, draslíkového kanálu pomocí látky tetraetylamonium TTA nebo vápníkového kanálu pomocí kobaltu (obr. 18).



Obrázek 18: Blokace membránových kanálů

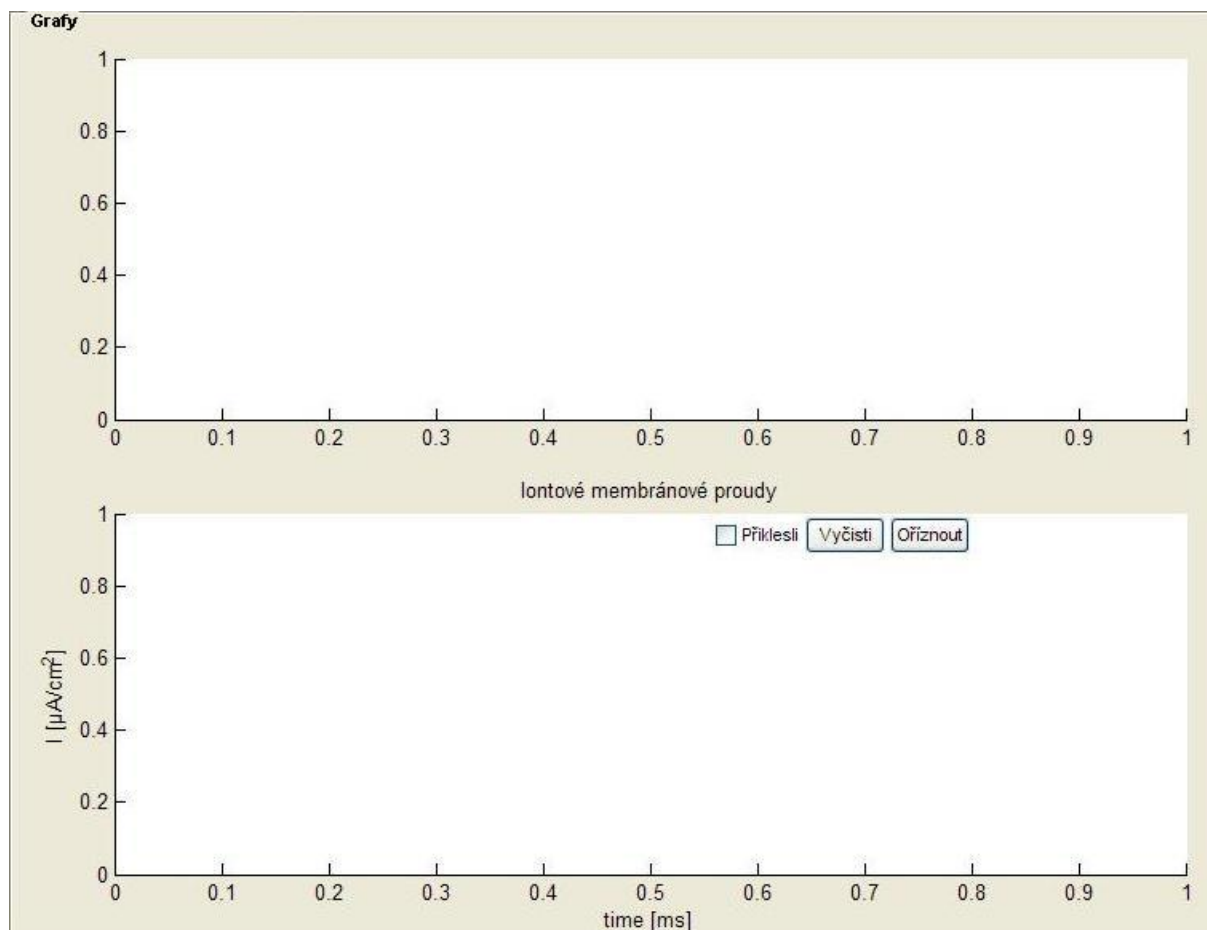
Obnovit základní nastavení

Obnova základního nastavení je aplikace realizována tlačítkem, při jehož spuštění dochází k nastavení všech parametrů, které jsou obsaženy v tomto programu, na výchozí hodnoty.

5.2 Grafické výstupy

Grafické výstupy (obr. 19) jsou v aplikaci zobrazeny v panelu Grafy. Vrchní graf zobrazuje stimulační impulsy. Tyto stimulační impulsy se mění v závislosti na použití metod vnuceného proud a vnuceného napětí. Spodní graf zobrazuje výsledek aplikace měřících metod. Tento graf umožňuje zobrazit různé výsledky, jejichž výběr se nachází v části nastavení zobrazených grafických výstupů. V tomto grafu se vyskytují tři doplňkové funkce. První doplňkovou funkcí je funkce Přikresli, kterou lze použít, pokud chceme porovnat průběhy pro různá nastavení, například koncentrace iontů nebo vodivosti iontových kanálů.

Další doplňkovou funkcí je tlačítko Vyčisti, která vyčistí tento graf od všech výsledných průběhů. Poslední doplňkovou funkcí je tlačítko Oříznout, která je dostupná pouze při zobrazení všech iontových proudů dohromady, a umožňuje lépe zobrazit průběhy těchto proudů.



Obrázek 19: Grafické výstupy

5.3 Zobrazení grafických výstupů

Tato část je rozdělena na okna Zobrazení grafu a Samostatné grafy (obr. 20). V okně Zobrazení grafu je nabídka grafů, které lze zobrazit do spodního grafu v okně Grafy. Tlačítko Zobrazit graf vykreslí zvolený graf do spodního grafu v okně Grafy. Nabídka zobrazení grafů se mění v závislosti na vybrané měřící metodě. Okno Samostatné grafy umožňuje zobrazit z uvedené nabídky prvků do samostatného okna, pro lepší analyzování průběhů. Tlačítko Zobrazit graf samostatně zobrazí vybrané grafy z nabídky.

Obrázek 20: Zobrazení grafů

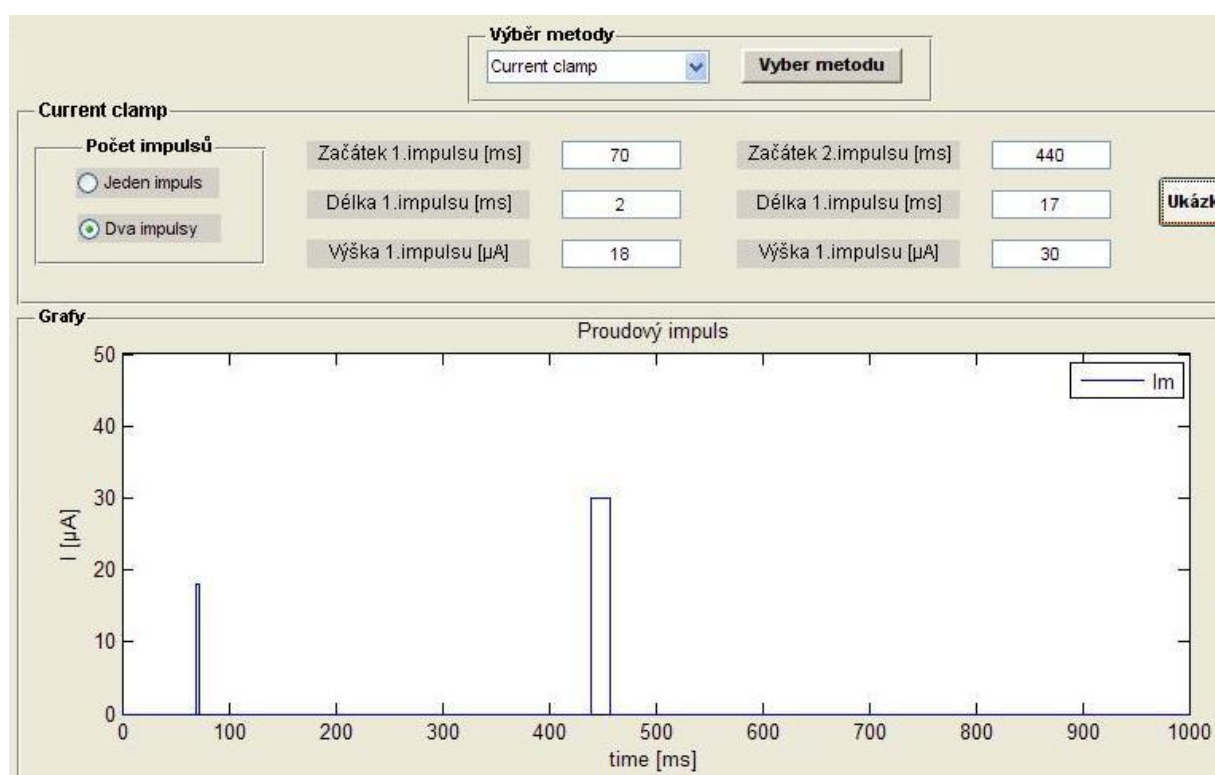
5.4 Výběr metody měření

V této části je realizována nabídka pro výběr měřicí metody, kterou chceme použít, a zobrazení parametrů pro tyto metody spolu s aktivačními tlačítky (obr. 21). Na výběr jsou dvě základní techniky, metoda vnuceného proudu (current clamp) a metoda vnuceného napětí (voltage clamp). Při spuštění programu je jako výchozí nastavení použita metoda vnuceného proudu. Při spuštění tlačítka Vyber metodu, dojde k zobrazení zvolené metody pod touto nabídkou.

Obrázek 21: Výběr metody měření

Metoda vnuceného proudu – current clamp

Tato část umožňuje realizovat proudový stimulační impuls, jeho ukázkou a aplikaci na model. Při nastavení stimulačního impulsu je umožněno vybrat, zda se bude jednat o jeden impuls nebo o dva stimulační impulsy (obr. 21). U obou impulsů lze nastavit jejich začátek, trvání a výšku. Všechny tyto parametry lze pro každý impuls nastavit libovolně. Při spuštění tlačítka Ukázka impulsu se v grafickém výstupu zobrazí průběh námi zvoleného impulsu. Při spuštění tlačítka Current clamp dojde k jeho aplikaci na model a výsledek se obrazí v grafickém výstupu. Ukázka stimulačních impulsů s rozdílným nastavením pro metodu current clamp je zobrazena na obrázku 22.



Obrázek 22: Ukázka stimulačních impulsů metody vnuceného proudu

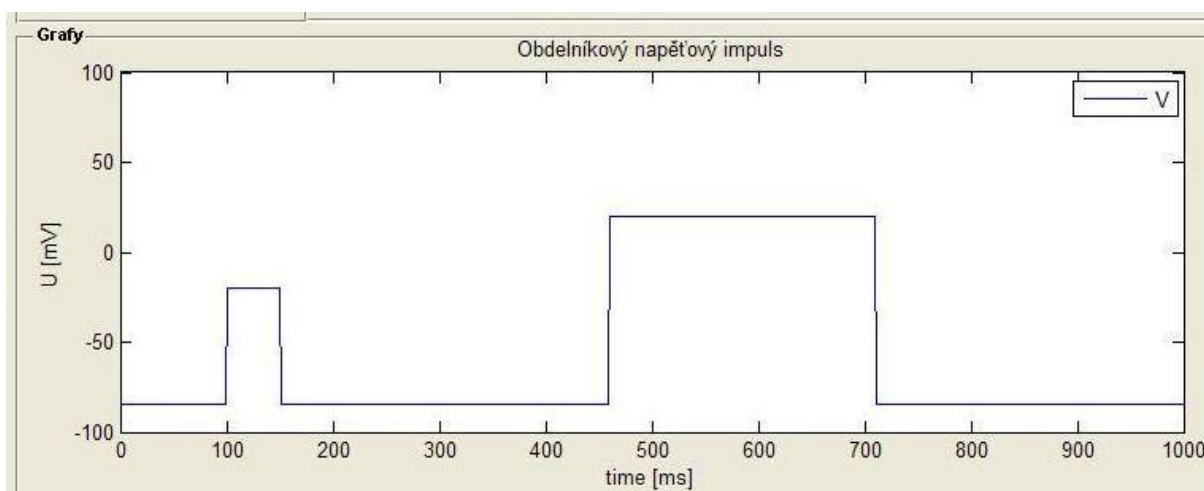
Metoda vnuceného proudu – current clamp

Při výběru této metody dojde ke změně panelu určené pro metodu vnuceného napětí (obr. 21). Objevuje se zde nabídka výběru typu impulsu, kde lze vybrat typ napěťový impuls pro metodu vnuceného napětí. Pomocí tlačítka Vyber typ impulsu lze zvolit z nabídky obdélníkový napěťový impuls, pilovitý ramp puls nebo sekvenci impulsů. Každý z těchto impulsů má své určité charakteristiky, proto při jejich vybrání dojde ke změně panelu obsahující parametry impulsu. Jako výchozí typ impulsu pro metodu vnuceného napětí je nastaven obdélníkový napěťový impuls. Dále jsou zde tlačítka pro ukázkou napěťového

impulsu a jeho aplikaci na model pomocí tlačítek Ukázka impulsu a Voltage clamp.

Obrázek 23: Metoda vnuceného napětí – obdélníkový impuls

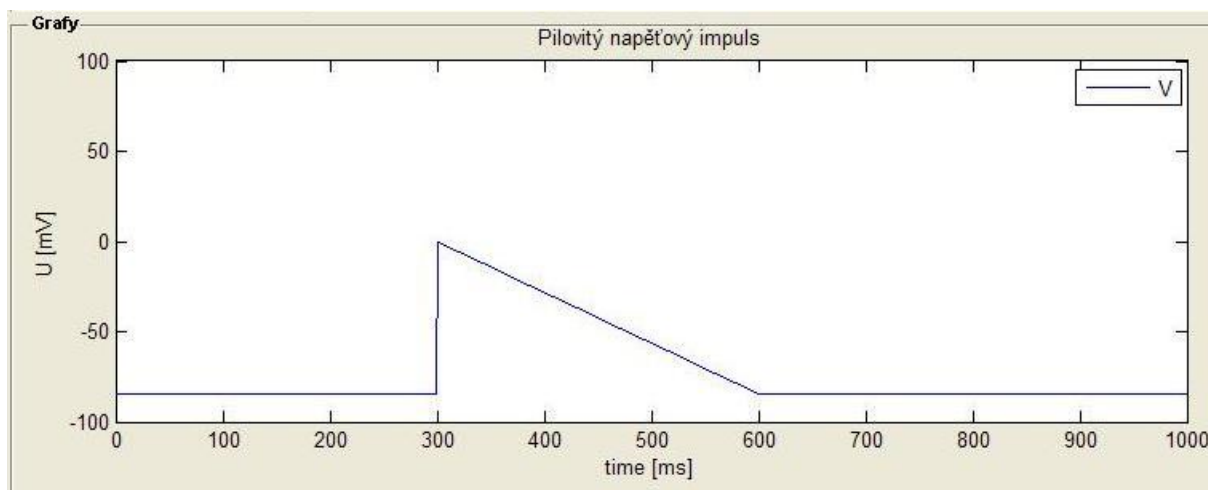
Při volbě obdélníkového impulsu, lze zvolit počet impulsů podobně jako u metody current clamp na jeden nebo dva impulsy. Dále lze nastavit začátky těchto impulsů, maximální napětí a délku trvání. Ukázka dvou rozdílných obdélníkových impulsů je na obrázku 24.



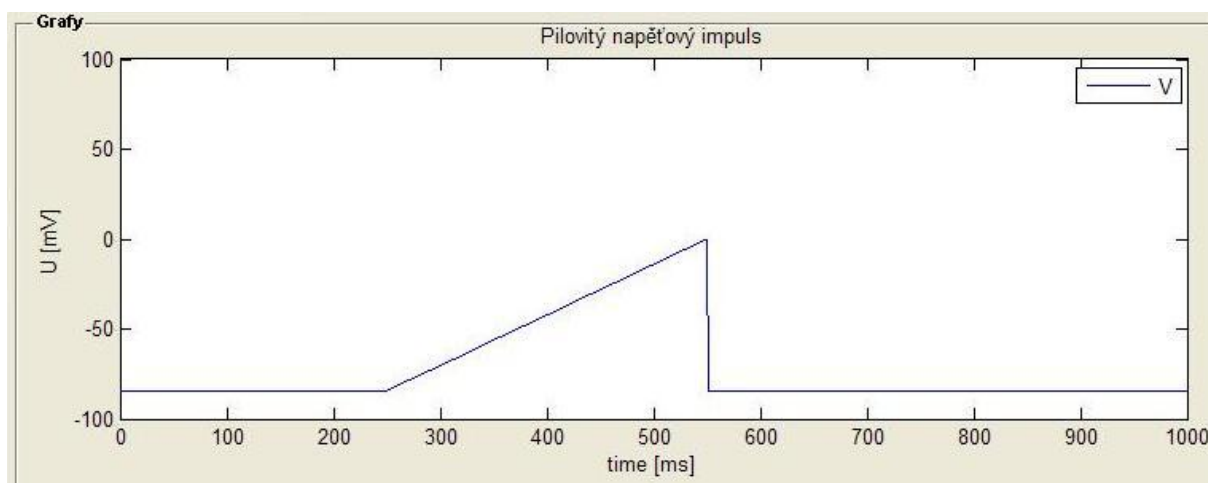
Obrázek 24: Obdélníkové napěťové impulsy

Pokud zvolíme při volbě typu impulsu ramp puls, zobrazí se panel (obr. 25) podobný jako při obdélníkovém impulsu. Obsahuje stejné parametry týkající se začátku a trvání impulsů a nastavení maximálního napětí. Kromě těchto parametrů lze též zvolit, jaký průběh bude mít tento ramp impuls. Průběh těchto impulsů může být buď klesající (obr. 26) anebo stoupající (obr. 27).

Obrázek 25: Panel pro ramp impuls



Obrázek 27: Klesající průběh ramp pulsu



Obrázek 26: Stoupající průběh ramp pulsu

Poslední možností při volbě typu impulsu je sekvence napěťových skoků, jejichž základem jsou obdélníkové impulsy. V panelu (obr. 28) pro nastavení sekvence napěťových impulsů lze vybrat z jednoho nebo dvou impulsů. U těchto impulsů je možné nastavit začátek a délku impulsů. Dále lze nastavit maximální a minimální napětí impulsů a velikost napěťových skoků. Ukázka sekvence napěťových skoků je zobrazena na obrázku 29.

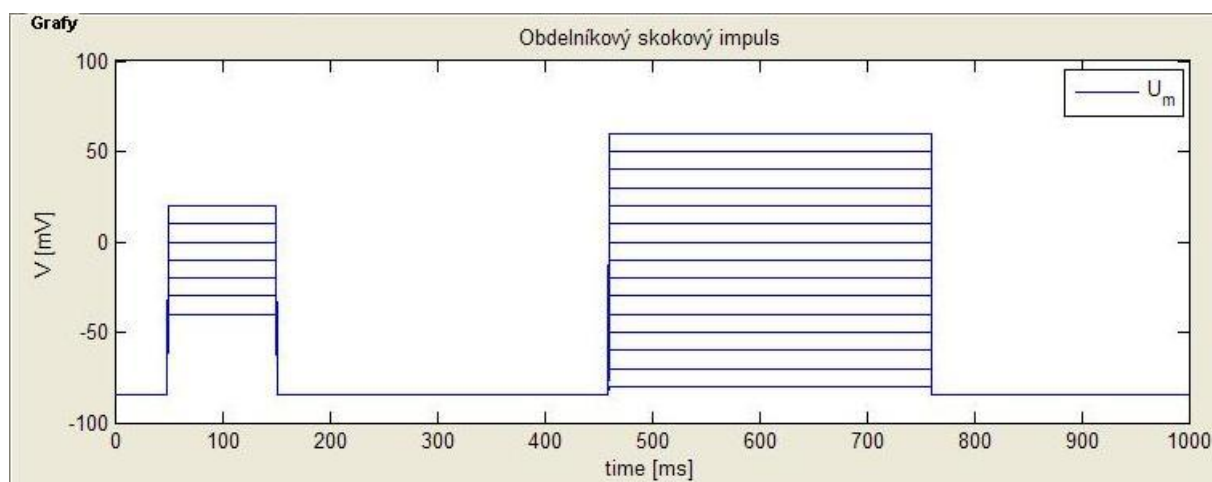
Výběr metody
 Voltage clamp

Voltage clamp
 Typ impulsu: Sekvence

Sekvence napěťových skoků
 Počet impulsů: ☒ Jeden impuls ☐ Dva impulsy
 Velikost skoků [mV]: 10

Začátek 1. impulsu [ms]		Začátek 2. impulsu [ms]	
10	460		
Maximální napětí [mV]: 0		Maximální napětí [mV]: 0	
Minimální napětí [mV]: -84		Minimální napětí [mV]: -84	
Délka impulsu [ms]: 300		Délka impulsu [ms]: 300	

Obrázek 28: Panel sekvence napěťových impulsů



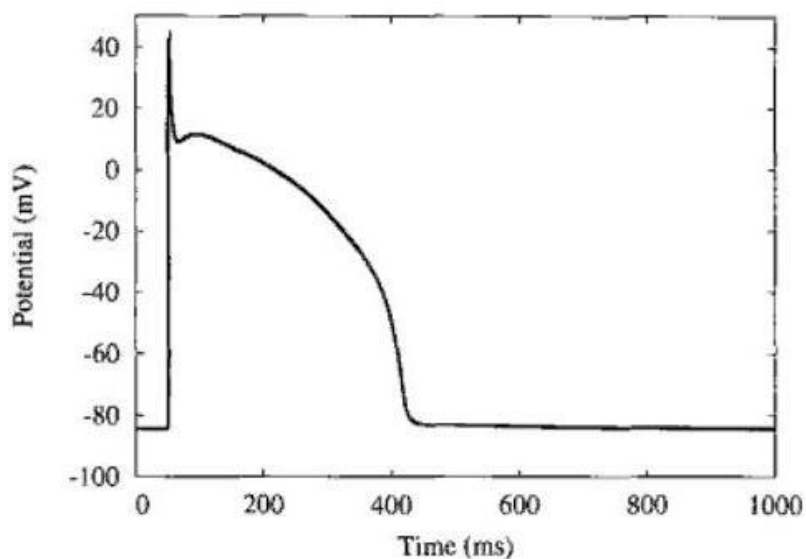
Obrázek 29: Sekvence napět'ových impulsů

6 Výsledky Luo_Rudy_program

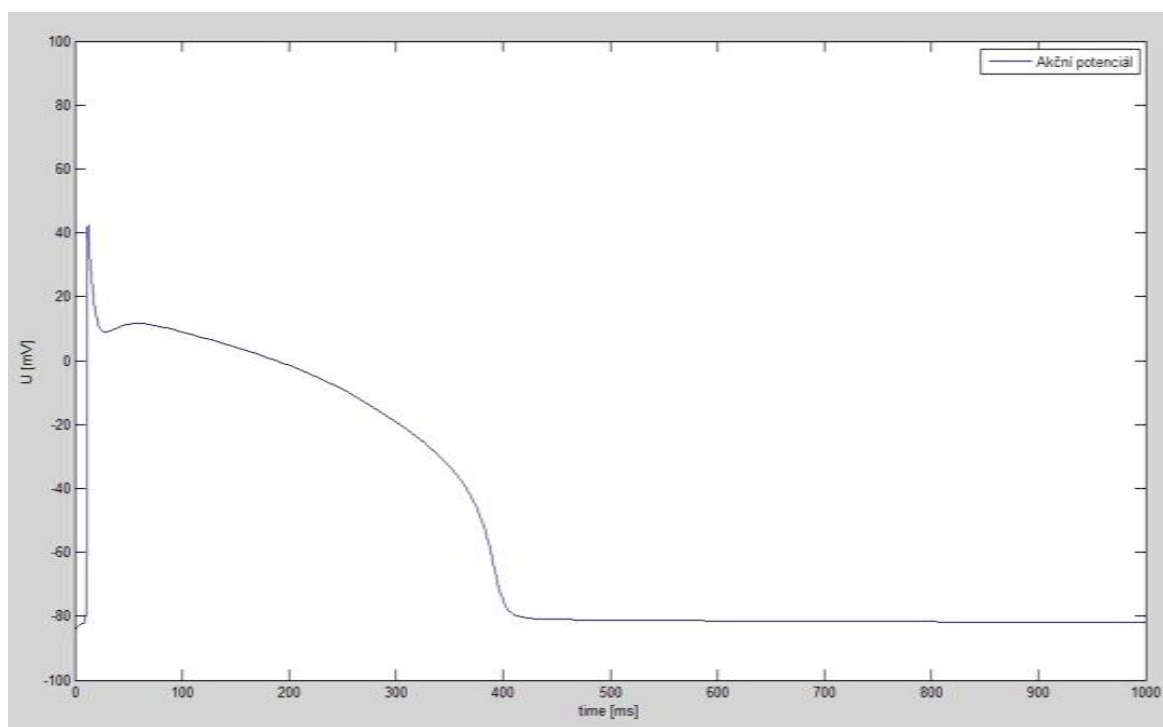
V následující kapitole 6.1 budou prezentovány výsledky aplikace Luo_Rudy_program a budou porovnány s literaturou [6] a [11]. V kapitole 6.2 budou prezentovány další výsledky této aplikace bez srovnání.

6.1 Srovnání výsledků s dostupnou literaturou

Na obrázku 30 je průběh akčního potenciálu s maximálním napětím přibližně 41mV a délkou trvání asi 400ms[11]. Na obrázku 31 je akční potenciál vytvořený pomocí vytvořeného programu Luo_Rudy_program. Tento průběh byl získat na základě simulace metody vnuceného proudu, kdy stimulační impuls trval 2ms a jeho výška byla 22 μ A. Při těchto parametrech impulsu dosahuje výsledný akční potenciál maximální hodnoty napětí přibližně 41mV a trvání lze odhadnout na 400ms. Z těchto hodnot a z podobnosti průběhů lze usoudit, že akční potenciály se shodují.

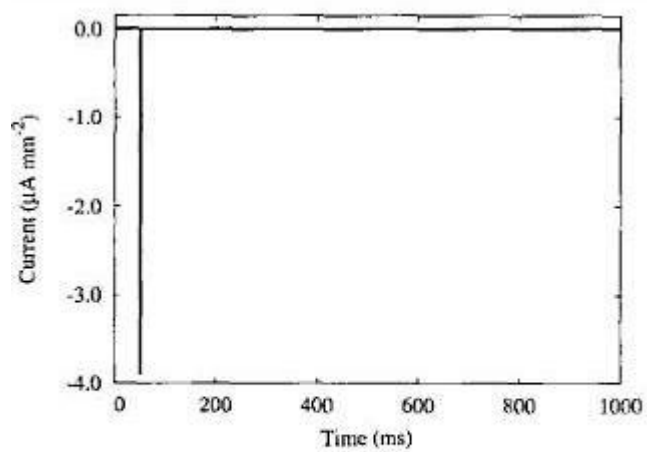


Obrázek 30: Akční potenciál[11]

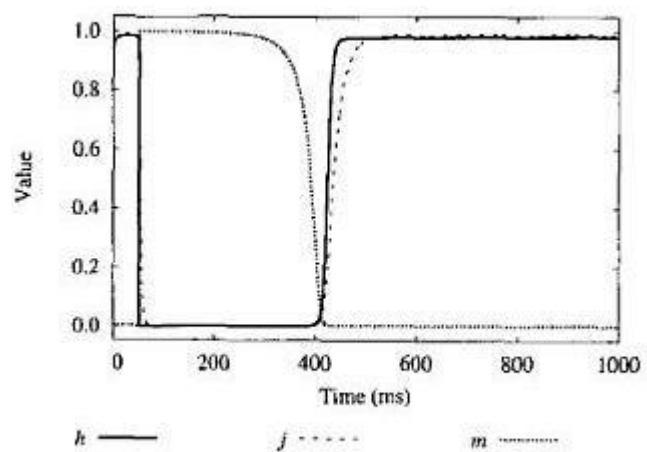


Obrázek 31: Akční potenciál Luo_Rudy_program

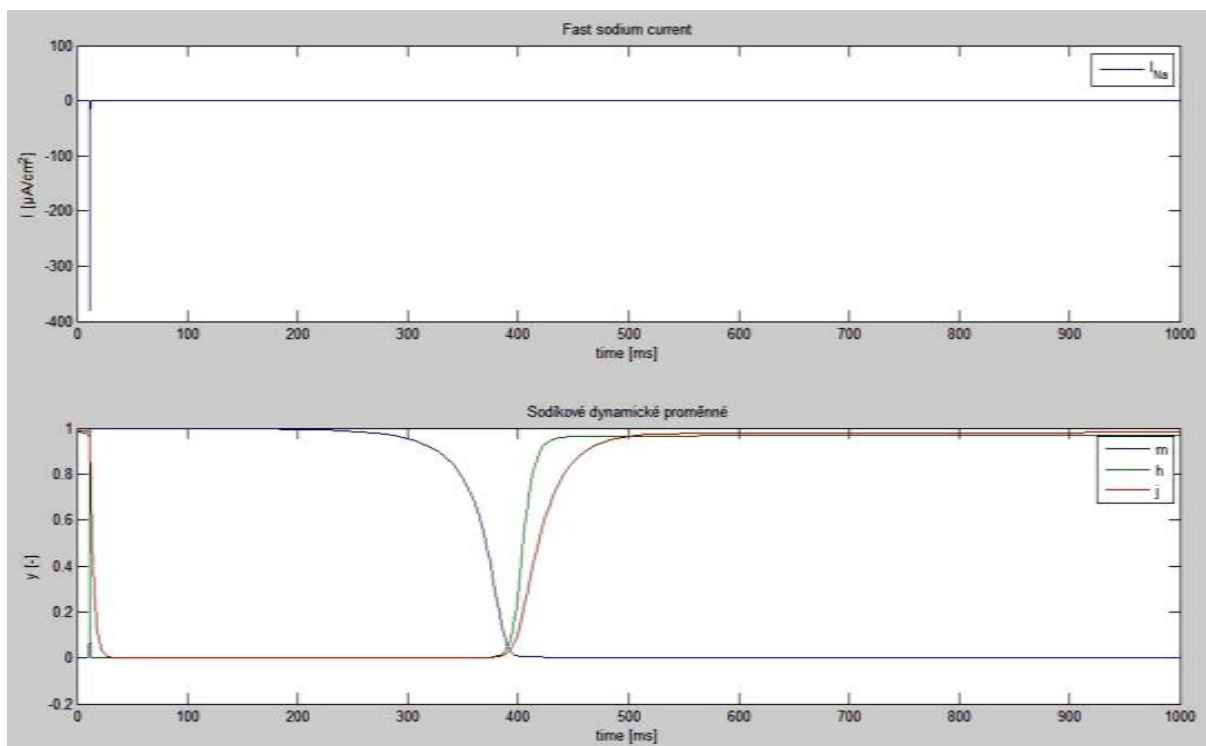
Na obrázcích 32 a 33 je zobrazen sodíkový iontový proud (fast sodium current) spolu s jeho vrátkovacími proměnnými. Při porovnání velikostí obou proudů dochází k značnému rozdílu mezi těmito proudy. Tento rozdíl je způsoben odlišnými jednotkami, ve kterých jsou proudy zobrazeny. Na obrázku 32 je proud uveden v jednotkách $\mu\text{A}/\text{mm}^2$ a na obrázku 33 v jednotkách $\mu\text{A}/\text{cm}^2$. Při sjednocení jednotek na $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ můžeme maximální hodnotu obou proudů odhadnout na $-380 \mu\text{A}/\text{cm}^2$. Při porovnání proměnných m , h a j dostáváme stejné průběhy.



(a)

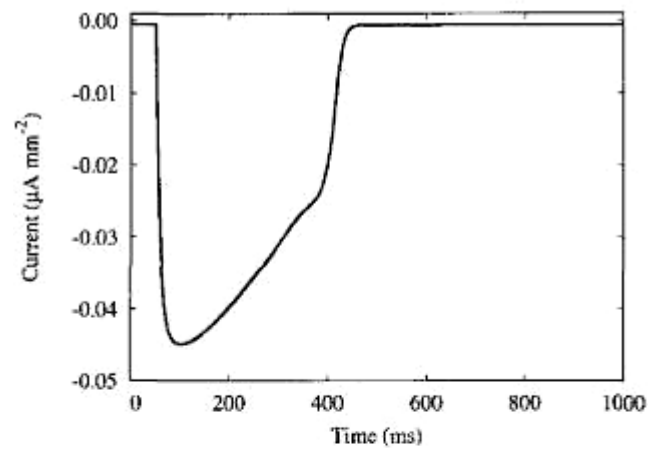


Obrázek 32: a) Fast sodium current, b) Vrátkovací proměnné[11]

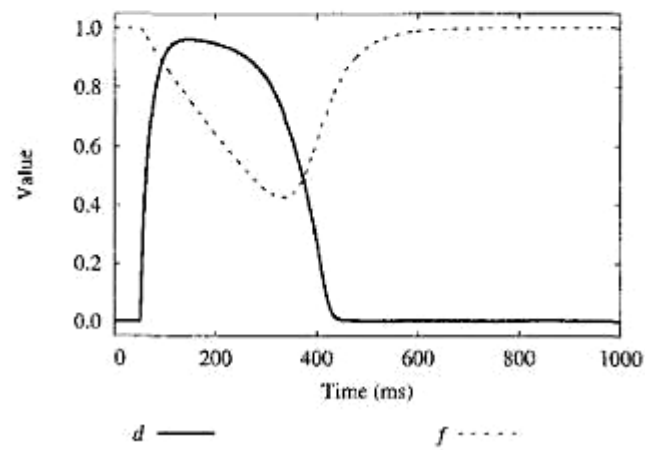


Obrázek 33: Výstup Luo_Rudy_program - fast sodium current a jeho vrátkovací proměnné

Na obrázcích 34 a 35 dochází ke srovnání vápníkový proud (slow inward current) spolu s jeho vrátkovacími proměnnými d a f . Na obrázku 35 je dále zobrazen časový vývoj vápníkové absorpce (calcium uptake). Při sjednocení jednotek na $\mu A/cm^2$, lze stanovit, že oba proudy dosahují maximální velikosti $-4,5 \mu A/cm^2$. Průběhy obou proudů jsou podobné, stejně jako průběhy vrátkovacích proměnných.

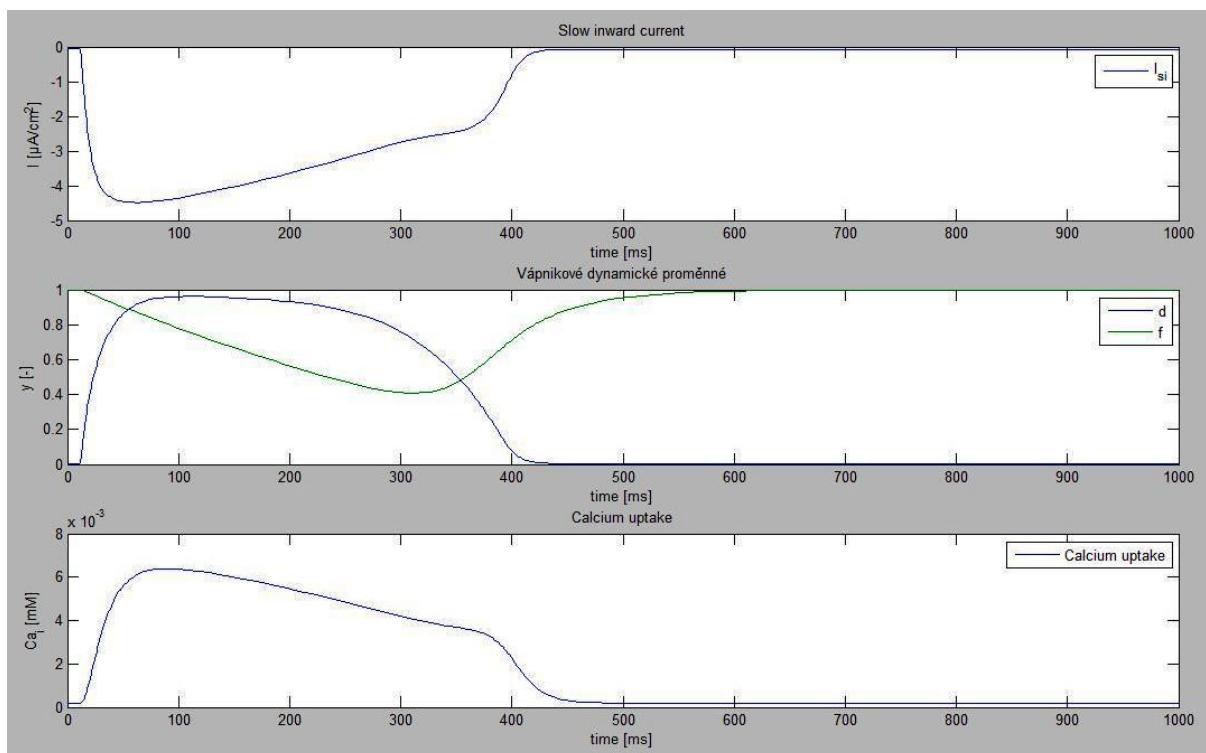


(a)



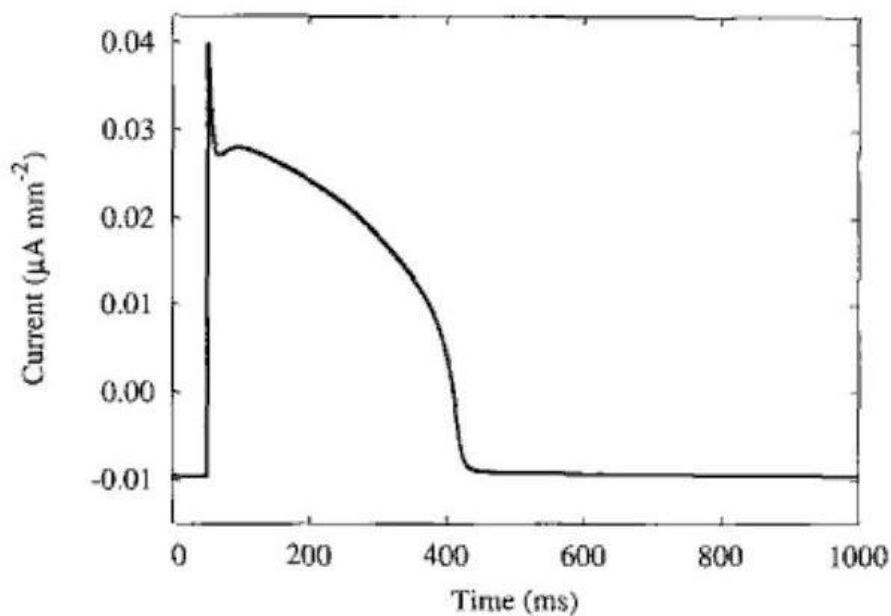
(b)

Obrázek 34: a) Slow inward current, b) Vrátkovací proměnné[11]

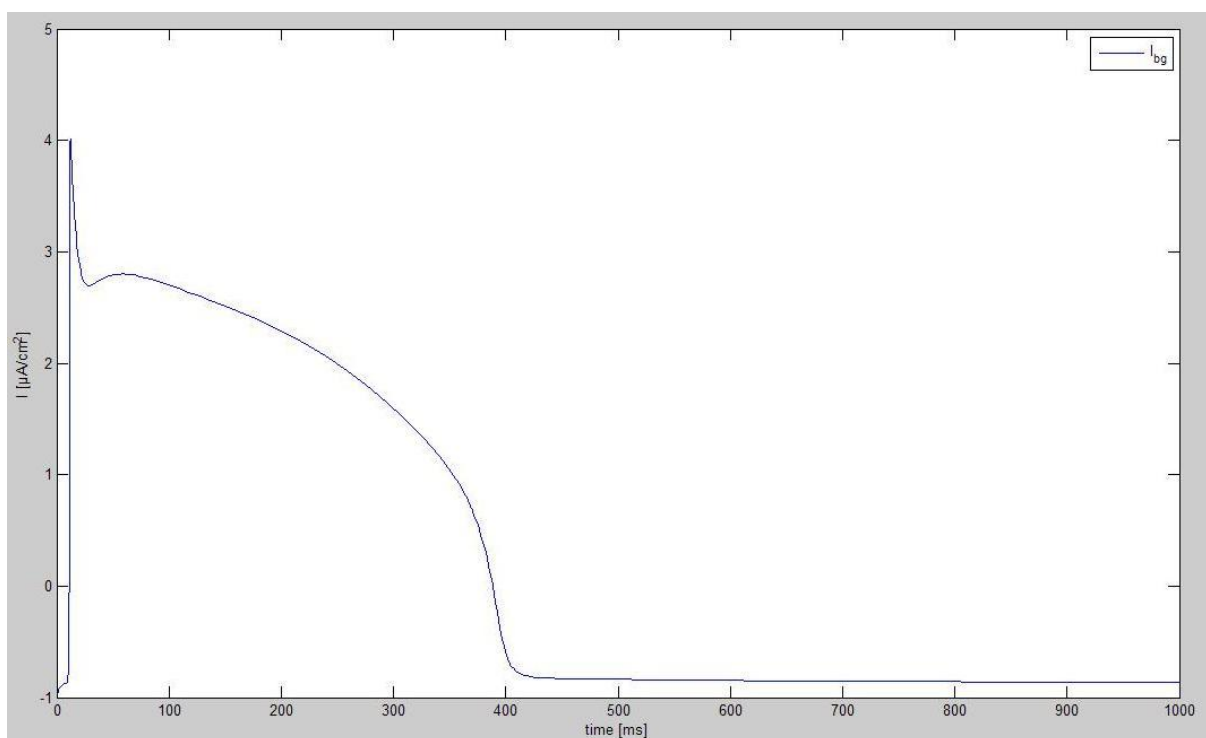


Obrázek 35: Slow inward current s vrátkovacími proměnnými a vápníkovou absorpcí vytvořený v Luo_rudy_program

Na obrázcích 36 a 37 je zobrazen proud pozadí (background current). Opět dochází ke shodě jak v maximální velikosti proud, tak i v ve tvaru průběhu.

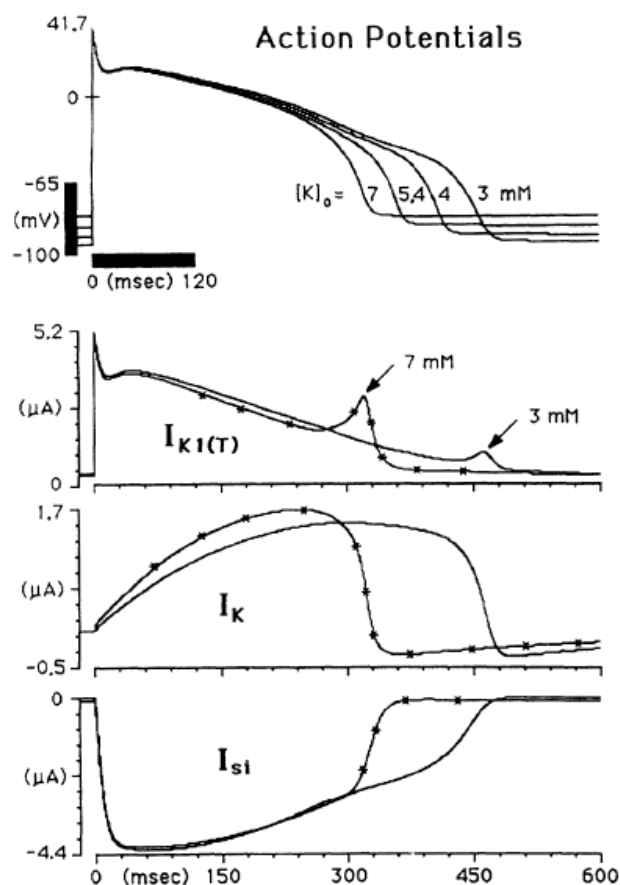


Obrázek 36: Background current[11]



Obrázek 37: Background current vytvořený v Luo_Rudy_program

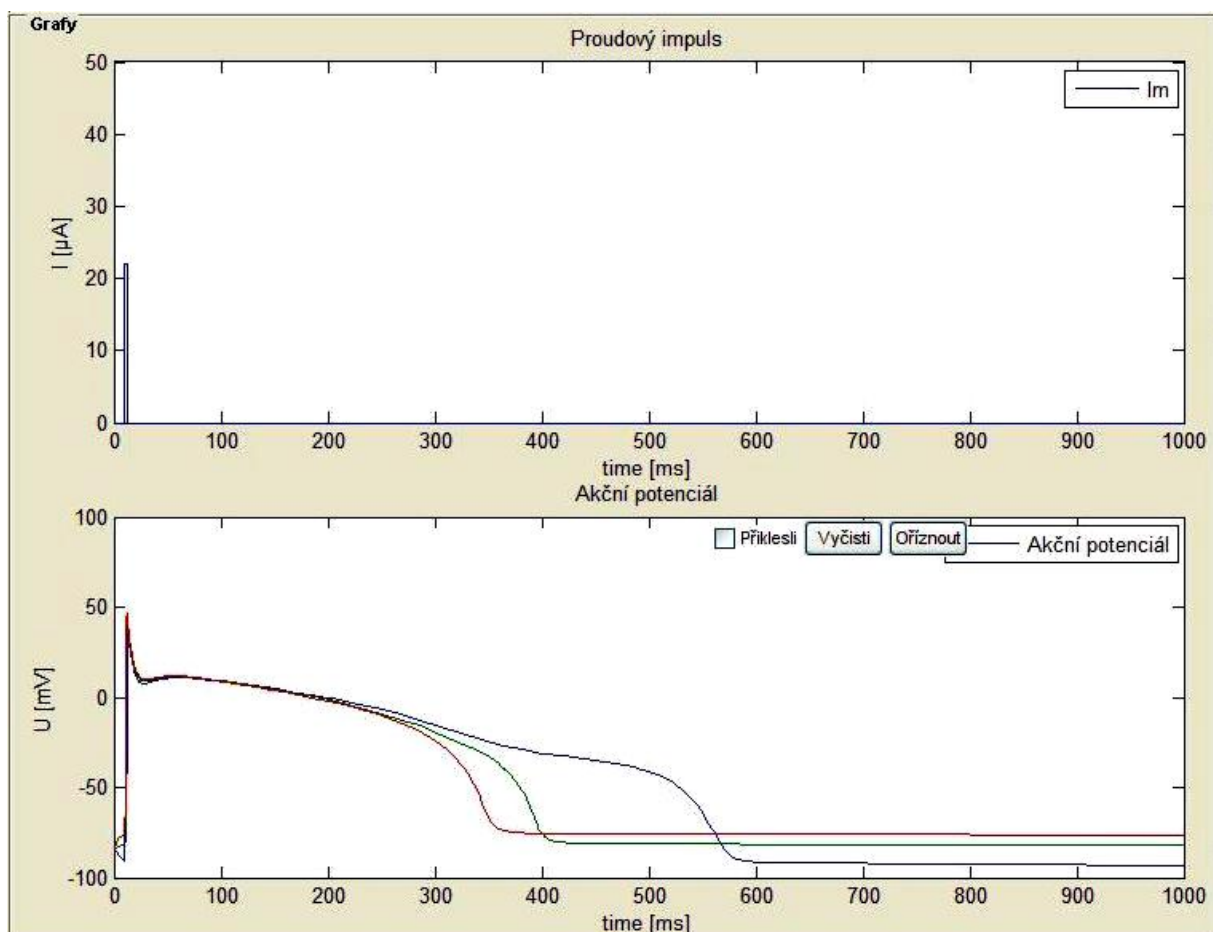
Na obrázku 38 jsou zobrazeny akční potenciály pro různé koncentrace extracelulárního draslíku K_o . Dále jsou zde zobrazeny průběhy iontových proudů $I_{K1(T)}$, I_K a I_{si} . Tyto průběhy platí pro koncentrace extracelulárních draslíkových iontů $K_o=3\text{mM}$ a $K_o=3\text{mM}$. Tyto průběhy pocházejí z práce Luo a Rudy[6].



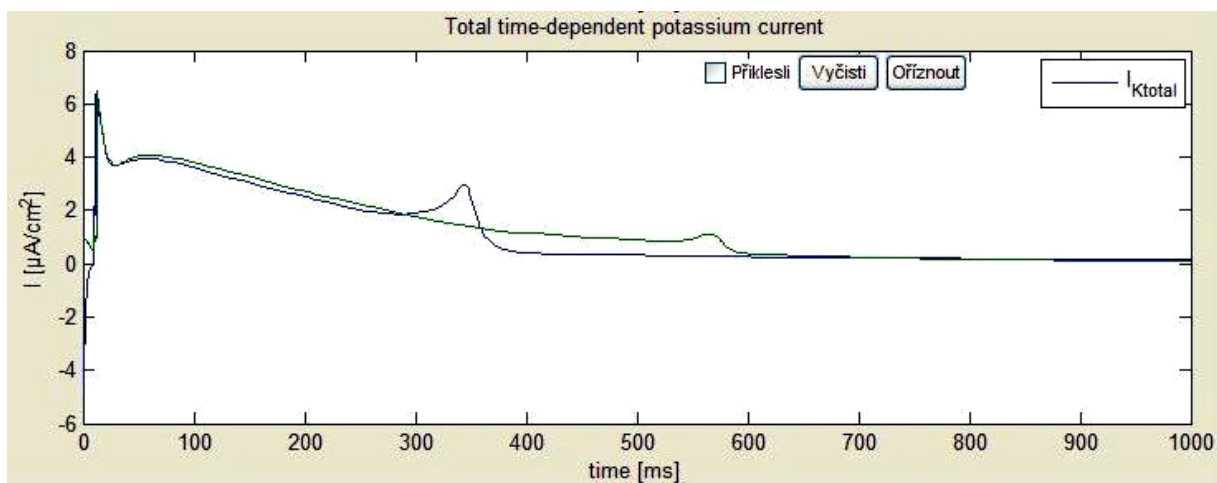
Obrázek 38: Akční potenciály a průběhy iontových proudů pro různé koncentrace iontů[6]

Pro srovnání těchto průběhů byl v aplikaci Luo_Rudy_program použita metoda vnuceného proudu, kdy proudový stimulační impuls měl velikost $22\mu\text{A}$ a délku trvání 2ms. Na obrázku 39 je zobrazen zmíněný stimulační proudový impuls a dále se zde nacházejí průběhy akčního potenciálu pro hodnoty koncentrace extracelulárních draslíkových iontů $K_o=7\text{mM}$ (červený průběh), $K_o=5.4\text{mM}$ (zelený průběh) a $K_o=3\text{mM}$ (modrý průběh). Obrázek 40, 41 a 42 obsahují namodelované průběhy iontových proudů $I_{K1(T)}$, I_K a I_{si} pro koncentrace $K_o=7\text{mM}$ a $K_o=3\text{mM}$.

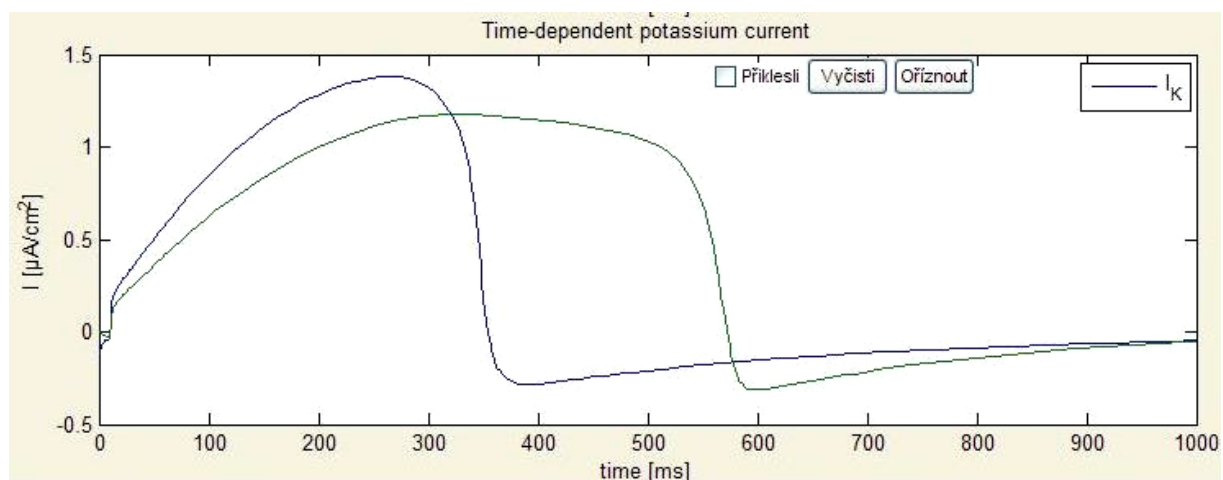
Při srovnání výsledků je vidět důležitý vliv koncentrace K_o na délku trvání akčního potenciálu i jednotlivých iontových proudů, kdy snížená koncentrace těchto iontů prodlužuje časové průběhy těchto prvků. Výstup akčního potenciálu z vytvořené aplikace správně simuluje toto časové prodloužení a také respektuje zvýšení hyperpolarizace. Jednotlivé iontové proud $I_{K1(T)}$, I_K a I_{si} svými časovými průběhy i velikostmi odpovídají průběhům uvedených v literatuře.



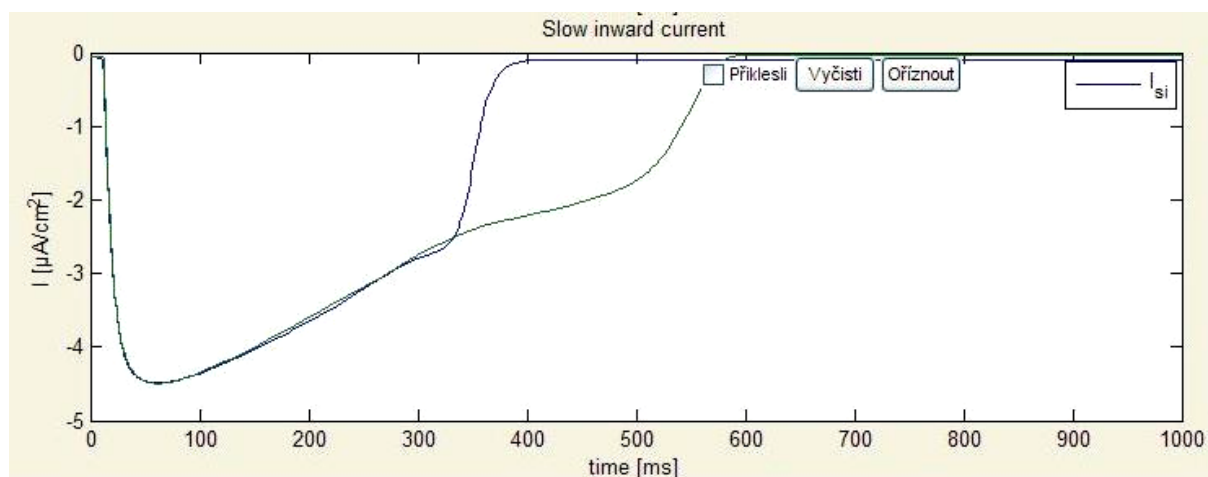
Obrázek 40: Stimulační proudový impuls a průběhy akčního potenciálu pro různé koncentrace draslíkových iontů



Obrázek 39: Total time-dependent potassium current pro $K_o=7\text{mM}$ (modrá) a $K_o=3\text{mM}$ (zelená)



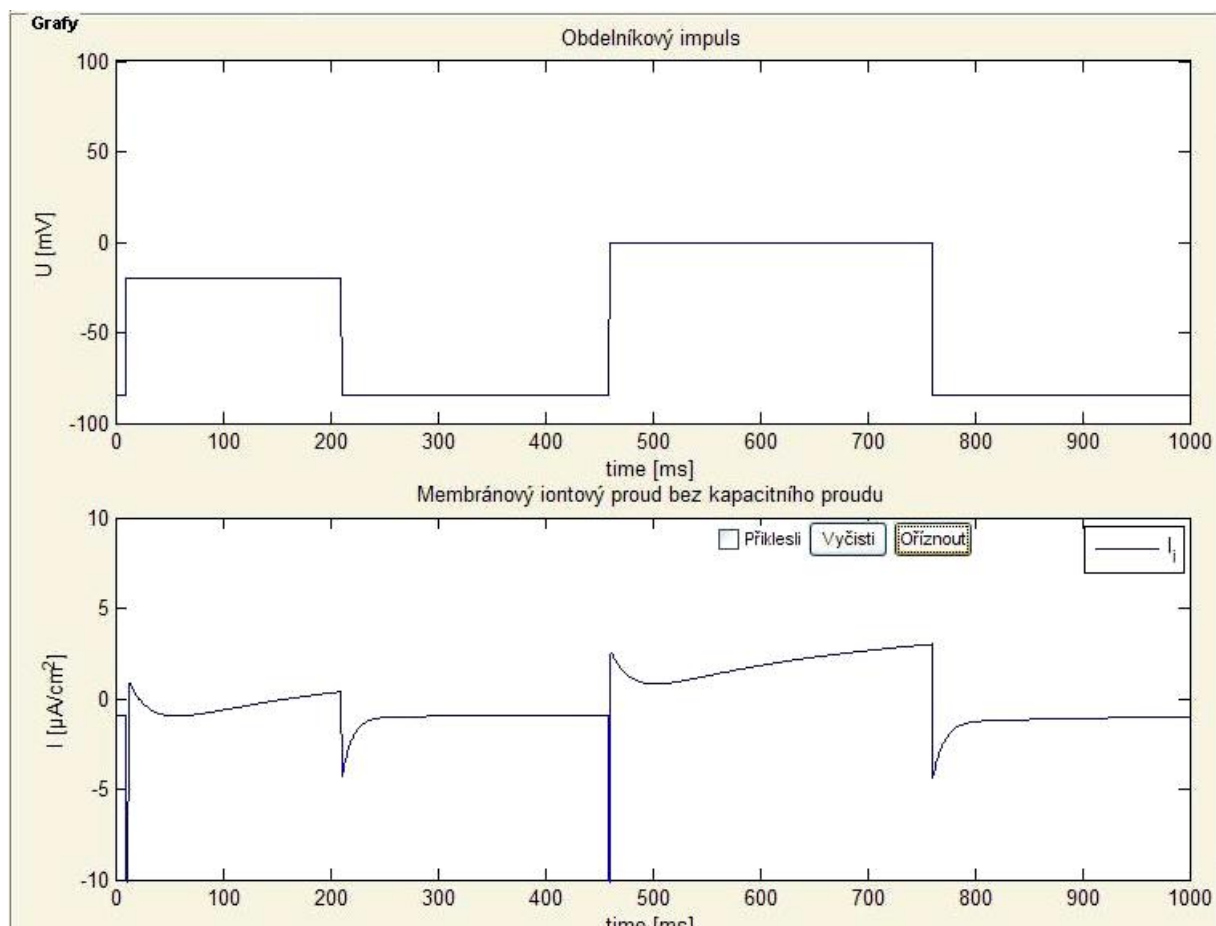
Obrázek 41: Time-dependent potassium current pro $K_o=7\text{mM}$ (modrá) a $K_o=3\text{mM}$ (zelená)



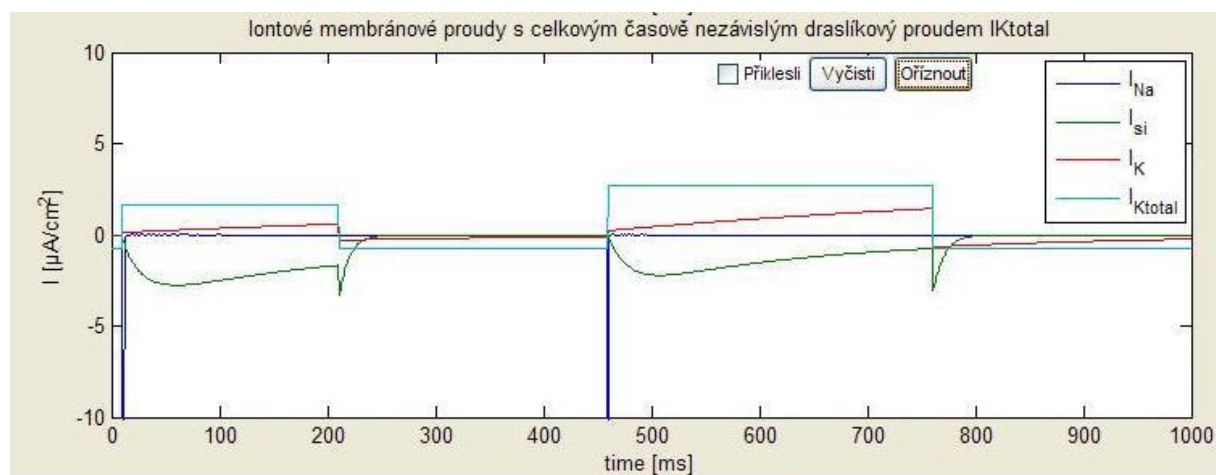
Obrázek 42: Slow inward current pro $K_o=7\text{mM}$ (modrá) a $K_o=3\text{mM}$ (zelená)

6.2 Další výsledky

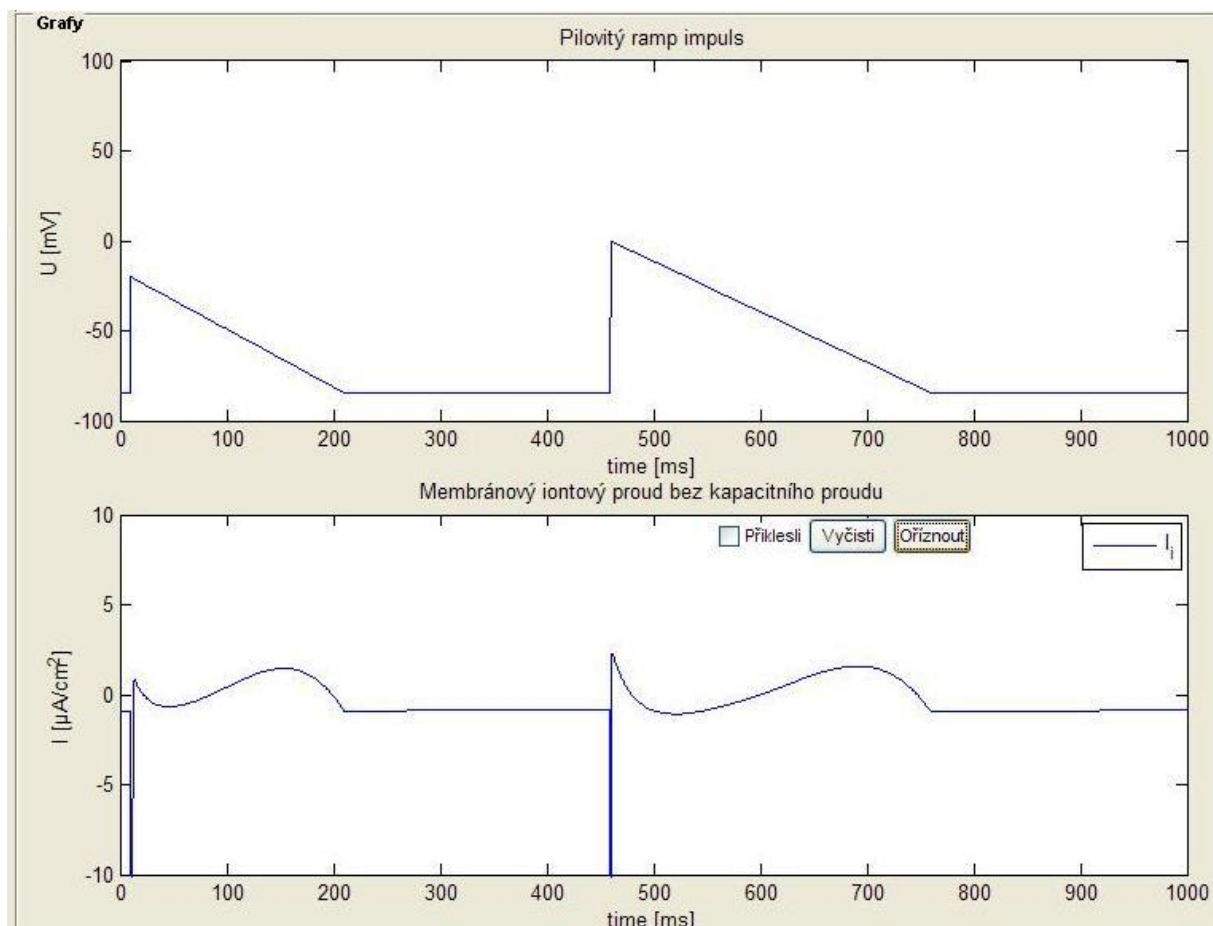
V této kapitole budou uvedeny grafy celkových iontových a jednotlivých proudů pro metodu vnuceného napětí (voltage clamp) s různými typy impulsů.



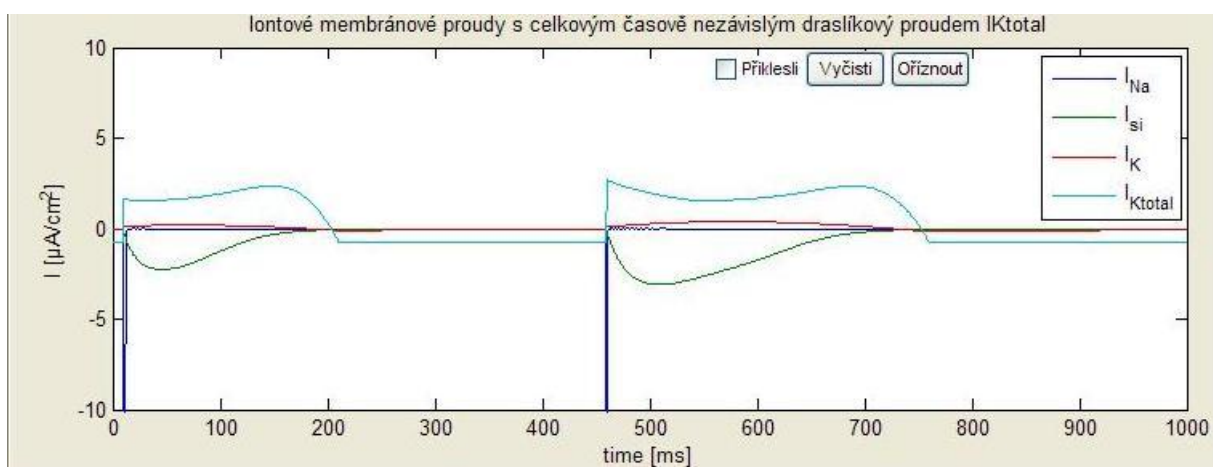
Obrázek 43: Obdélníkové napěťové impulsy a odezva celkového iontového proudu



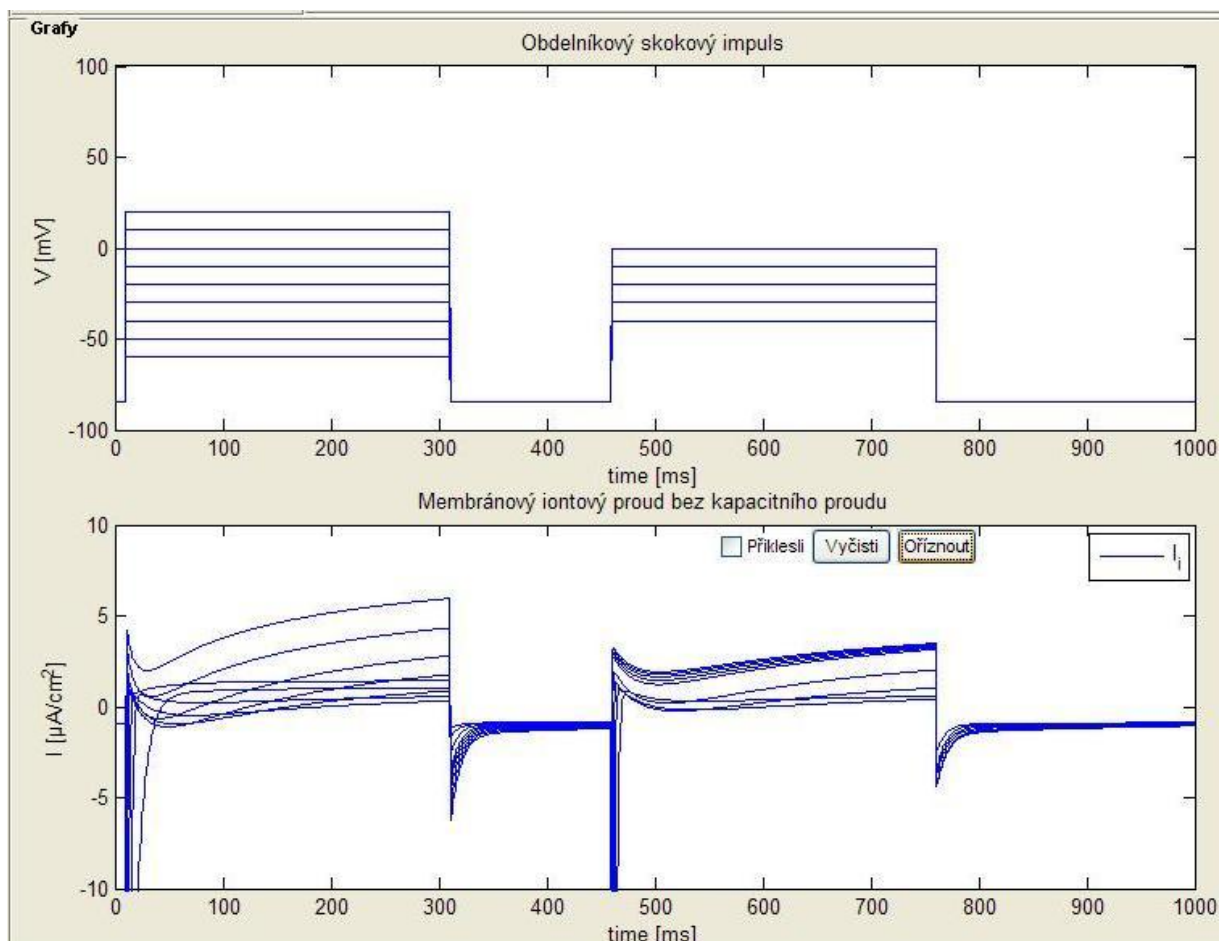
Obrázek 44: Iontové membránové proudy jako odezva na obdélníkový napěťový impuls



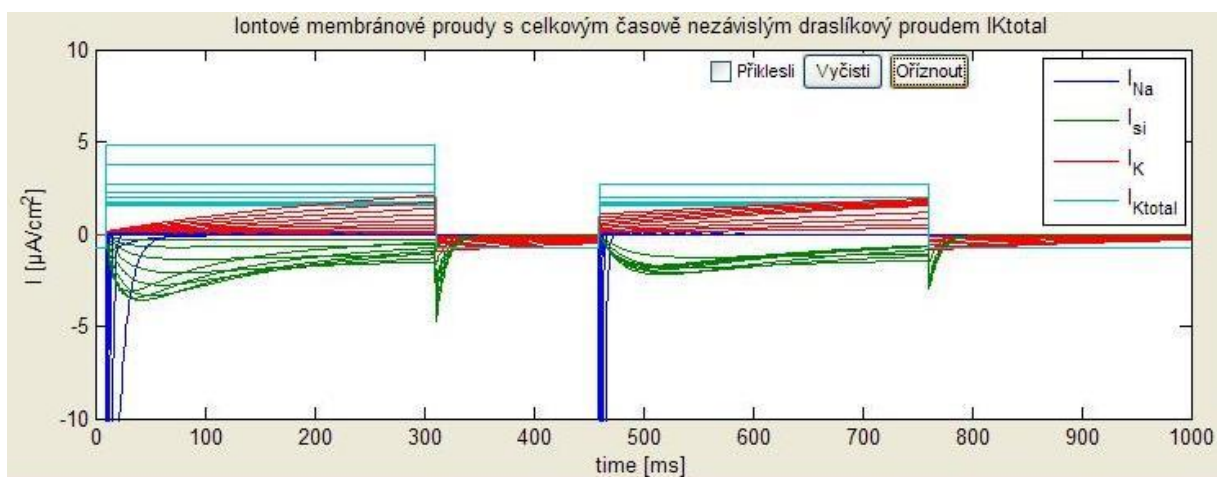
Obrázek 45: Pilovitý napěťový ramp impuls a odezva celkového iontového proudu



Obrázek 46: Iontové membránové proudy jako odezva na pilovitý napěťový ramp impuls



Obrázek 48: Sekvence obdelníkových impulsů a odezva celkového iontového proudu



Obrázek 47: Iontové membránové proudy jako odezva na sekvenci obdelníkových napěťových impulsů

Závěr

Cílem této práce bylo seznámit se s principy měření elektrofyzilogických dějů na izolovaných buňkách a vytvořit program simulující elektrické děje probíhající na buňce.

V prvních kapitolách byla rozebrána buňka jako hlavní střed zájmu elektrofyzilogie. Byla popsána její struktura, kde se především uplatňuje buněčná membrána spolu s druhy iontů, které se vyskytují v intracelulárním a extracelulárním prostředí. Jako základní bioelektrické jevy byly zmíněny akční potenciál a klidové membránové napětí. Další části se zabývali možnostmi, jakým způsobem lze vytvořit náhradní schéma buněčné membrány a rozvoj modelování elektrické aktivity buňky.

V dalších kapitolách byly rozebrány metody vnuceného proud a napětí, které se používají při získání informací o elektrických vlastnostech izolované buňky. Byla zde rozebrána i technika patch clamp, která byla podrobně popsána spolu s různými variantami, které se při měření na izolovaných buňkách používají.

Poslední kapitoly jsou věnovány realizaci programu vytvořeného v programu Matlab s uživatelským rozhraní, který byl též vytvořen v program Matlab GUI, a prezentaci výsledků, které jsou srovnány s literaturou. Jako základ tohoto programu byl použit matematický model akčního potenciálu savčí komorové buňky, jehož autory jsou Luo a Rudy. Tento program obsahuje kromě základních nastavení koncentrací extracelulárních a intracelulárních iontů, maximálních vodivostí iontových kanálů a počátečních podmínek měření, umožňuje zvolit ze základních měřících metod pomocí metod vnuceného proudu a vnuceného napětí. Další možnosti nastavení se týkají volby blokace membránových kanálů, kdy lze zvolit některou z látek, která má vliv na zablokování specifického kanálu. Při použití metody vnuceného napětí je k dispozici několik typů impulsů, které lze použít při skutečném měření. Program tvoří i grafické výstupy, které zobrazují stimulační impulsy závislé na zvolené metodě měření a grafy vytvořené jako odezva na tyto impulsy. Výsledné grafy lze zobrazit přímo do programu nebo je možné vykreslit do samostatných oken. V poslední kapitole jsou některé výsledky srovnány s literaturou. Při těchto srovnání docházelo k velké shodě mezi výsledky získanými z programu a výsledky z literatury a proto lze označit, že program pracuje správně.

Aplikace Luo_Rudy_program lze použít jako výukový program studentům pro lepší pochopení získávání informací o bioelektrických jevech na základě různých metod měření.

Seznam literatury

- [1] HRAZDÍRA, Ivo; MORNSTEIN, Vojtěch. Lékařská biofyzika a přístrojová technika. Brno: Neptun, 2001, 396s. ISBN 80-902896-1-4
- [2] ŠIMURDA, Jiří. Bioelektrické jevy. [elektronická skripta]. [cit. 2010-11-01]. Dostupné z WWW:
<<https://www.vutbr.cz/elearning/mod/resource/view.php?id=102090>>.
- [3] HAMMIL, O. P., MARTY, A., NEHER, E., SAKMANN, B., SIGWORTH, F. J. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membráně patches. Pflügers Archiv European Journal of Physiology, 1981, vol. 391, s. 85-100
- [4] OGDEN, David; STANFIELD, Peter. Patch clamp techniques for single and whole-cell recording. [online], s. 53-78. [cit. 2011-04-20]. Dostupné z WWW:
<http://www.utdallas.edu/~tres/microelectrode/microelectrodes_ch04.pdf>.
- [5] RYCHTÁRIK, Milan. Měření a modelování elektrických vlastností izolovaných srdečních buněk. Brno, 2008. 16s. Pojednání o disertační práci na Fakultě elektrotechniky a komunikačních technologií Vysokého učení technického v Brně na Ústavu biomedicínského inženýrství. Školitel: prof. Ing. Ivo Provazník, Ph.D.
- [6] LUO, Ching-hsing; RUDY, Yoram. A Model of the Ventricular Cardiac Action Potential. Depolarization, Repolarization, and their interaction. Circulation Research, 1991, vol. 68, s. 1501-1527
- [7] DOSTÁL, Jiří; PAULOVÁ, Hana; SLANINA, Jiří; TÁBORSKÁ, Eva. Biochemie pro bakaláře. Brno: Vydavatelství MU, 2005, 174s. ISBN 80-210-3232-4
- [8] WILHEM, Zdeněk, a kolektiv. Stručný přehled fyziologie člověka pro studijní programy. Brno: Vydavatelství MU, 2005, 115s. ISBN 80-210-2837-8
- [9] MOLNAR, Peter; HICKMAN, James J.. Modeling of Action Potential Generation in NG108-15 cells. [online], s. 9. [cit. 2011-05-15]. Dostupné z WWW:
<<http://pegasus.cc.ucf.edu/~pmolnar/Neuron%20modeling1211.pdf>>.
- [10] PANDIT, S., V., et. al. A Mathematical Model of Action Potential Heterogeneity in Adult Rat Left Ventricular Myocytes, Biophysical J., 2001, vol. 81, s. 3029-3051

- [11] PULLAN, A. J.; CHENK, L. K.; BUIST, M. L. Mathematically modelling the electrical activity of the heart: from cell to body surface and back again. [online]. [cit. 2011-05-15]. Dostupné z WWW: http://books.google.com/books?id=ZWxyg7_ufxkC&pg=PA116&dq=Luo+rudy&hl=cs&ei=qbm2TZ-AHiresgbsvrzTDQ&sa=X&oi=book_result&ct=result&resnum=1&ved=0CCkQ6AEwAA#v=onepage&q=voltage%20clamp&f=false.
- [12] HALLIWELL, V. J.; PLANT, D. T.; ROBBINS, J.; STANDEN, B. N. Voltage clamp techniques. [online], s. 17-35. [cit. 2011-05-15]. Dostupné z WWW: http://www.utdallas.edu/~tres/microelectrode/microelectrodes_ch02.pdf.
- [13] KOGAN, Boris Y.; SHPILFOYGEL, Simon D. Investigation of Cardiac Cell Recovery Processes in Luo and Rudy model. [online], [cit. 2011-05-15]. Dostupné z WWW: <http://fmdb.cs.ucla.edu/Treports/950006.pdf>.
- [14] ZAPLATÍLEK, K. Matlab tvorba uživatelských aplikací. Ben - technická literatura, Praha 10, 1. vydání, 2004
- [15] ZAPLATÍLEK, K. Matlab pro začátečníky. Ben - technická literatura, Praha 10, 2. vydání, 2005